日本水産学会誌

第二十三巻　第十号

Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 23, No. 10, 1958

目　　次

昭 和 三 十 三 年

日　本　水　産　学　会

The Japanese Society of Scientific Fisheries

TOKYO

CONTENTS

* In Japanese with synopsis in English.

All communications and publications should be addressed to :
Japanese Society of Scientific Fisheries, c/o Tokyo University of Fisheries, Shiba Kaigandori 6-chome, Tokyo, Japan.

日本水産学会投稿規定

1. 報文の投稿者は本会員個人に限る。但し会員外の共同研究者を含むことは差支えない。
2. 報文は投稿者の原著で他の刊行物に未発表のものに限る。
3. 報文は総て本会に送付し，本会に到着した日を以つて，受付月日とし，受付けた原稿は総て編集長の指定する2名の編集理事が回覧し，掲載可と認めたものはそのまゝ受理する。この場合の受理月日は受付月日とする。編集理事が其のまゝ掲載することに疑義をいだいた場合は編集長にその旨報告する。この場合編集長は編集会議を招集，審議し，受理し得ないと認めた場合はその理由を附し，原著者に返却し，訂正を求める。この場合の受理月日は，学会が訂正原稿を受理した月日とする。受理した論文は，その受理月日の順に掲載する。但し，その報文又は報文抄録が印刷費著者負担の場合は，会誌を増頁して掲載する。抄録を希望する場合は本論文をそえて提出すること。
4. 原稿1篇の長さは原則として刷上り4頁（表題．200 語の英文抄録を除き，図表の占める紙面を含め約 7000 字相当）とする。原稿一篇の学会負担の基準印刷費（7.200 円）を超過した場合は著者が負担する。
5. 会員が会費又は著者として負担すべき印刷費の支払いを怠るときは，支払いのあるまでその会員の報文の受理又は掲載を見合せることがある。
6. 邦文報告には原則として 200 語以内の英文抄録（題名と著者名とを附記，名前は省略せぬこと，）を添える。
7. 図表には英文の説明をつける。邦文を併用してもよい。
8. 投稿の細目については別に定める注意書きに従う。

投稿に関する注意

1. 原稿を投稿するときには，本会所定の投稿カード（請求により配付する）に必要事項を記入し，之を原稿に添え本会に提出する。
2. 初校は原則として，著者が校正する（校正は迅速に行う事)。尚文章又は図，表の変更や追加は禁ずる。再校以後は編集部で校正する。
3. 英文抄録，図及び表の表題，説明等の英訳を希望される向はその原案を添えて投稿されたい。但し実費を申し受ける。
4. 別刷りの料金（X円）は次の式によつて算出される通りとする。X＝(1＋P)（N—50）円P：頁数，N：別刷数（50 部を単位とする）従つて 50 部までは頁数に関らず無料である。特に表紙をつけることを希望される場合は，著者負担によつてこれをつける。(50 部当り 300 円)
5. 投稿後掲載までの間に著者の連絡先が変つたときには必ず通知されたい。

原稿の書き方

原稿は会誌体裁の統一，誤りの防止，編集印刷の便宜上次の諸規定を守られたい。既出報文との調和其の他のために例外を望まれる著者はその都度明記されたい。

1. **邦文原稿**は本会所定の原稿用紙にペンで横書きにし，記述は簡単明瞭にし新かなづかいを用いて難かしい漢字はさける。英文抄録は本文とは別葉にする。
2. **欧文原稿**は厚手の上質紙に2段送りのタイプで打つ。欧文本文以外の欧文個所はペン書きでもよいが必ず活字体を用いる。
3. **字体の指定**は右の如く赤で入れる。

abcd	abcd	Abcd	ABCD	OO\1)/	A/12\
イタリ	g, ゴヂ	(大)	s. c.		
Italic	**Gothic**	CAPITAL	CAP. & SMALL CAP.	うわつき（かたつき）	したつき

4. **表題** 主題・副題は別行に書き各々ピリオド（.）をつけない。第○報の場合はローマ数字（I，II）にして（——）でつなぎ数字の後に（.）をつける。
英文主題では第一語の他，名詞，副詞，形容詞，〔動詞は慣用に従う〕の頭文字は大文字にする。

5. **著者名** 邦文では連名の時は（・）で連ねる。ローマ字では名の頭を Capital 後は Small，姓の頭を Capital 後は Small Capital にする。連名の時は（,）で連ね最後の名の前を（and）で連ねる。（&）は用いない。末尾に（.）はつけない。

6. **所属** 著者名の下に（ ）で囲む。本文が邦文の時は英文の所属は入れない。但し著者が希望すれば脚註で入れてもよい。本文が英文の時は字体を *Italic* にする。

7. **図表** 表題，説明，内容とも英文で書く。必要ならば邦文併用もよい。番号は（Fig. 1. Table 1.）とする。番号，表題，説明は図ではその下に，表ではその上に入れる。表の細かい説明は下でもよい。邦文併用の時は邦文の番号（第1図，第1表）は省く。図表は必ず本文と別葉にし，本文中に挿入個所を赤で指定する。又本文中に引用する時は（Fig. 1，Table 1）を用いる。

8. **附図** 附図は1頁大の図版で（Plate）とし，なるべく図末に入れる。原図が写真であつても本文中に組込む時は Fig. にする。附図の番号はローマ数字（I，II）を用いる。

9. **生物名** 邦文ではカタカナの和名の次に，学名を *Italic*（命名者名は Roman で頭文字を Capital，後を Small Cap.）で入れ，英文では俗名の次に学名を邦文と同様に入れる 。〔その間は（,）で切る〕これを原則とするが論文により必要がなければ一部又は全部の学名，俗名を略してもよい。学名は（ ）で囲まない事。

10. **化学名** 邦文中の外来語の化学名は一般的なものはカタカナを用い，英文を用いねばならない時は Small で入れる。

11. **人名** まぎれない時は姓のみを記し名と敬称とを省いてもよい。欧名でも姓のみで頭文字は後は Capital，後は Small capital で書く。

12. **単位及び記号** 単位を表わす文字は英文中では（C.，cc.，m*l*.，kg.，m.）の如く（.） をつける。但し（Ω, μ, γ, N, M, pH，及び方位の N, S, E, W）には（.）をつけない。邦文中ではこれらの（.）はすべて省く。量を代表する記号は（長さ *l*，高さ *h*）の如く *Italic* にする。

13. **邦文本文中の外国語**（横文字の場合）は人名，地名，ドイツ語の名詞等を除き Small で入れる。同一邦文中で同一物名の和洋語の混用はさける。

14. **文献** 本文中の関連個所にうわつきで一貫番号をつけ一括して末尾に集める。番号はアラビヤ数字（1,2,3）を用い片カッコ（1),パーレン）で囲み各行の末尾にピリオド（.）をつける。著者名は姓と名とを書き著者名の後はコロン（：）で切る。雑誌名の略し方は慣用方に従う。日本水産学会誌のことは本誌とする。英文雑誌名は *Italic* で書く。雑誌の巻番号は **Gothic** にする。西歴年号は必ず入れる。文献の見出しは（文献，References）とする。同一著者名，同一雑誌名を連記する時は(——)で略してもよい。

文献の書き方について著者の都合で上の指定によらない時は特にその事を付記しておく事。

15. **脚註** 脚註は数字でない記号（*，**）を用い関係頁の下段に入れ巻末に集めない。

病原性水生糸状菌の生理生態に関する研究－II.

新崎 盛敏・野沢 洽治・三宅 真
（東京大学農学部水産植物教室）

On the pathogenetic water mold—II.

Seibin ARASAKI, Koji NOZAWA and Makoto MIYAKE

The resistance of *S. parasitica* aganist malachite green was variable according to its life-time; i. e. the growth of hyphae was restrained completely in pepton-solution with 0.02 ppm., and the formation of zoosporangia or gemmae, and the germination of resting spores were checked with 0.2 ppm. (Fig. 1, Table 3)

The correlation diagram between the concentration of M.G. and the time need to kill the hyphae or sporangia on the eggs of *Hypomesus olidus* was shown as a straight line when both factors were expressed in logarithum (Fig. 2).

As the infection of the disease could not be checked unless the formation of zoospore ceased, it may be safely said that the disease is carried chiefly through zoospores (Table 3).

From these experiments, it is suggested that in practice controling the disease, it may be enough to treat the trout eggs for about 20 minutes in 5 ppm. of M.G., and in the case of the eel it may be necessary to use more concentrated M.G. solution than 0.2 ppm.

かつて新崎はコイ卵やコイ仔魚を害する糸状菌（*Saprolegnia parasitica*?）に対する種々の農薬，医薬品，色素類の効果について調べ，第1表及び第2表にみられるような結果を得た。これよりみて卵の正常孵化，仔魚の正常発育に悪影響を与えずして病菌体の発生や生育を完全に阻止し得るようなものはないが，従来ひろく使用されていたフォルマリンやマーキュロクローム等よりも，ウスプルン（水銀剤）や色素のマラカイトグリーン，クスタルバイオレット（ピオクタニンも含める），等が有望らしいことが推察された。マラカイトグリーンの効果については，すでに米国で認められ，本邦にも紹介されて広く実用に供されている。しかしその基礎的な面の研究は殆んどなく，実地における効果がいかなる機構によるものであるのか，即ち菌を完全に殺しているのか，菌糸の生長を止めているのか，游走子形成を阻害しているのか，游走子を殺して感染を防止しているのか等等の細かい点については不明である。

保科・大久保[1]等は種々の濃度のマラカイトグリーン（malachite green；以下 M.G. と略記する）を含む培地で菌を培養し，菌体の生長に対するM.G. の抑制効果を見，又短時間高濃度のM.G.につけた後に正常の培地に植えて致死効果を見た。これ等はいづれも固体培地を使用しているが，前報[2]の pH の実験からもうかがえるように液中と固体上とでは結果に非常な相違があるので液中の場合についてもしらべて見る要があると思われる。そこで液中の水生菌に対するM.G.の効果を，低濃度における菌体の生長ならびに器官形成，胞子の発芽力等の抑制，高濃度における致死限界と時間との関係等についてしらべ，それ等の結果から水生菌の感染機構についての検討をおこなつた。

1. 低濃度のマラカイトグリーンによる抑制効果

a）生長への影響： 一般に毒物は生物に対して，極く微量では促進的に仂き，濃度が増すにつれて抑制的に転化して遂に致死的となる。そしてある範囲内では濃度と抑制の度合の間に函数関係が見られることが多い。はじめに生長を完全に抑制するM.G.濃度より以下の範囲についてしらべた。

菌体の生長のみはみられるが，游走子嚢や Gemma は形成されない pH 7 のペプトン溶液中にM.G.を加えて，その濃度が 0.001 ppm から 0.6 ppm の間を第1表にあるような段階に，対数的にほゞ等間隔になるように調整した培地を作り試験管に入れる。これに別に寒天上に分離しておいた菌体の小片を入れて 21° Cに保つ。1日後と4日後に菌体が管を満して上昇する高さを測定した。測定は常に夫々2乃至3シリーズについて行い，その平均をとつたが誤差はきわめて小さかつた。

1957 年9月3日受理　　※. 文部省科学研究費による研究

Table 1. Effect of miscellaneous chemicals in continuous soaking experiments, on a pathogenetic *Saprolegnia* parasitized on carp eggs or carp flies.

reagent \ concentration \ day passed		1 day	2 days	3 days	4 days	Effect on carp or carp-egg
Copper-sulphate	10^{-4}	×	×	×	—	d.
	10^{-5}	×	3.5	4.0	6.0(f)	d.
	10^{-6}	×	3.5	7.0	7.5(f)	n.
USUPULUN (organic-Hg)	10^{-4}	×	×	×		d.
	10^{-5}	×	±	3.5	2.5	ab.
	10^{-6}	×	4.0	5.8	7.0(f)	ab.
KURAITO (Cl-salt)	10^{-4}	×	×	×	—	d.
	10^{-5}	0.5	4.0	5.5(f)	—	ab.
	10^{-6}	±	4.0	8.0(f)	—	n.
Formaline	10^{-3}	×	3.5	4.0	—	n.
	10^{-4}	×	3.0	6.0	—	n.
	10^{-5}	±	8.5	8.0(f)	—	n.
Mercurochrom	10^{-4}	×	×	×	×	d.
	10^{-5}	0.5	2.5	3.5	4.0	ab.
	10^{-6}	±	2.5	—	5.5	ab.
Rivanol	2.10^{-5}	×	×	×	×	d.
	10^{-5}	0.5	—	5.5	6.0	n.
	10^{-6}	0.5	—	4.0(f)	—	n.
Malachite green	10^{-4}	×	×	×		d.
	2.10^{-5}	×	×	×	0.5	d.
	10^{-5}	×	1.0	1.0	1.5	d.
	10^{-6}	±	1.0	1.5	2.5	ab.
Crystal violet	2.10^{-5}	×	×	×	×	d.
	10^{-5}	×	±	0.5	1.0	d.
	10^{-6}	×	×	×	×	ab.
	10^{-7}	×	±	0.5	0.5	n.
	10^{-8}	±	0.5	3.5	3.5	n.
Eosine	2.10^{-5}	0.5	2.5	4.0	5.0(f)	n.
	10^{-5}	0.5	3.0	4.0	4.0(f)	n.
	10^{-6}	0.5	4.0	5.0	7.0(f)	n.
Methylene blue	2.10^{-5}	×	×	×	×	d.
	10^{-5}	0.5	2.5	2.5	4.0	ab.
	10^{-6}	0.5	3.0	3.0	5.0	n.
Trypaflavine	2.10^{-5}	×	×	×	×	n.
	10^{-5}	±	2.0	3.0	8.5(f)	n.
	10^{-6}	0.5	3.0	3.0	8.0(f)	n.
Thionine	2.10^{-5}	±	1.0	—	6.0	n.
	10^{-5}	0.5	1.5	—	5.0	n.
	10^{-6}	0.5	3.0	—	7.0	n.

Remarks. figures show the length of mycelia in mm.; ×‥non infect.; ±‥doubtful infect.; (f)‥with zoosporangia. d.‥dead, n.‥normal, and ab.‥abnormal hatching or development of carp-eggs and carp-flies.

結果は *S. parasitica* は 0.02ppm. で完全に生長され，0.001ppm. でもなお20％前後の抑制がみられたが，前報において耐 M.G. 菌株と述べた C_3 においては，生長が完全に抑制されるのは 0.1ppm. であり，しかも 0.01ppm. 以下では却つて生長が促進されるのが認められた。対照の生長を 100％として縦軸にとり，M.G.

Table 2. Effect of miscellaneous chemicals on the development of a pathogenetic *Saprolegnia.*, parasitized on carp eggs or carp flies (experiments in short time's treatment).

		2 days		4 days		Effect on carp eggs or carp flies. (obs. 4 days)	
		A	B	A	B	A	B
Control		+ (1.5)		++ (5.0)		d (0).n	
Copper-sulphate	10^{-4}	×	×	×	×	d(100).	d(100)
	5.10^{-5}	×	×	×	×	d(85).ab	d(96).
	10^{-6}	×	×	++(4.5)	++(2.5)	d(30).ab	d(50).ab
USUPULUN (organic-Hg)	10^{-3}	×	+(1.5)	+(2.0)	+(2.5)	d(0).n	d(0).n
	5.10^{-4}	×	×	×	+(1.0)	d(5).n	d(0).n
	10^{-4}	×	×	+(3.5)	+(3.5)	d(0).n	d(0).n
Formaline	10^{-2}	×	×	±	±	d(20).n	d(15).n
	5.10^{-4}	×	×	×	×	d(1).n	d(0).n
	10^{-4}	×	×	×	×	d(8).n	d(5).n
Mercurochrom	10^{-3}	+(1.5)	+(1.5)	++(6.5)	+(5.5f)	d(40).ab	d(30).
	5.10^{-4}	+(3.0)	+(2.5)	++(6.0f)	++(6.0f)	d(35).n	d(0).n
	10^{-4}	+(3.5)	+(3.5)	++(6.5f)	++(6.5f)	d(0).n	d(0).n
Rivanol	2.10^{-4}	+(2.5)	+(2.0)	+(4.5)	+(5.5)	d(30).n	d(95).ab
	10^{-4}	+(2.5)	+(2.5)	+(4.5)	++(5.5f)	d(5).n	d(85).ab
	10^{-5}	+(2.0)	+(2.0)	++(5.0f)	++(6.0)	d(30).n	d(20).n
Malachite green	2.10^{-4}	×	×	×	×	d(100)	d(100)
	10^{-4}	×	×	×	×	d(100)	d(100)
	10^{-5}	×	×	×	±(0.5)	d(0).n	d(20).n
Crystal violet	2.10^{-4}	×	×	×	×	d(10).n	d(100)
	10^{-4}	×	×	×	×	d(40).n	d(26).n
	10^{-5}	×	×	×	×	d(0).n	d(2).n
Eosine	2.10^{-4}	×	×	+(4.5)	×	d(20).n	d(0).ab
	10^{-4}	×	×	+(6.0f)	×	d(15).n	d(0).n
	10^{-5}	×	+(1.5)	++(4.5)	++(5.0)	d(20).n	d(10).n
Methylene blue	2.10^{-4}	±	×	+(5.0)	+(2.5)	d(0).n	d(10).ab
	10^{-4}	+(1.0)	+(0.5)	+(5.0)	+(4.5)	d(2).ab	d(20).ab
	10^{-5}	++(2.5)	+(2.0)	++(4.5)	+(4.0)	d(20).n	d(40).ab
Trypaflavine	2.10^{-4}	×	×	+(2.5)	×	d(85).ab	d(100)
	10^{-4}	+(2.5)	×	+(5.5)	+(5.0)	d(16).n	d(70).ab
	10^{-5}	++(2.5)	+(3.0)	++(5.5f)	+(5.0f)	d(25).n	d(45).n
Thionine	2.10^{-4}	±	±	+(5.5)	+(5.0)	d(35).ab	d(25).n
	10^{-4}	+(2.0)	+(1.5)	++(5.5)	++(5.5)	d(70).n	d(67).n
	10^{-5}	+(1.5)	+(1.5)	++(5.5f)	++(5.0)	d(68).n	d(80).n

Remarks : A·· 30 minutes, and B·· 60 minutes treatment in the solution. ×·· non infect; ±·· doubtful infect., and +, ++·· the degree of unquestionable infection. figures in ( )·· the length of mycelia, and f·· with zoosporangia.
In column 'Effect on carp eggs …… : d (0···15···100)·· percentage of dead eggs-
n or ab. ·· normal or abnormal development of carp flies hatched.

の濃度を横軸に対数にとると，第1図に示すような曲線となり，この図から種々の濃度における抑制度を推定することができる。尚この実験では接種するときに菌糸の先の若い部分の小片を用いたが，別に生長した菌体全体を無損傷のまゝ使つて実験すると，多少高い濃度の方へ全体の傾向が移る。又この実験はすべて21° Cでおこなつた結果で，他の温度に関しては検討していない。温度が変れば上記の限界が変ることは当然考えられることで，将来検討すべき大切なことであろう。

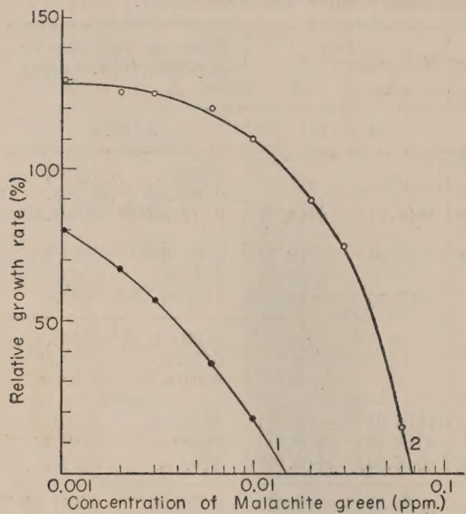


Fig 1. Resistance of water molds against malachite green : growth rate is relatively shown comparing with that of the control determined as 100%.

1. *S. parasitica*
2. the unidentified strain isolated from trout egg that had been treated by M.G.

b) 器官形成への影響： 感染に重要な役割を果たすと考えられる游走子嚢形成及び游走子嚢やGemma 内における游走子形成，Gemma の発芽，体眠胞子(resting spore)の発芽，等に対するM.G.の影響は，あるいは菌糸に対する作用よりも重要であると思われる。先ず游走子嚢の形成についてしらべるために，菌を麻の実に純粋培養し游走子嚢が形成される前のもの（菌糸の先端がやゝふくらみかけたもの）を各段階の M.G. 液で培養してその後の変化をみた。その結果は *S. parasitica* においては大体菌糸の生長出来る範囲の濃度（即ち 0.03 ppm 以下）では正常な胞子嚢が形成された。次に游走子嚢又は Gemma を集め M.G. の蒸溜水溶液中に置くと1 ppm 以上では原形質が収縮破壊されるが，0.1ppm以下では游走子嚢，Gemma 共に游走子を形成し放出した。一方M.G. ペプトン液中に置いた Gemma は 0.2 乃至 0.3 ppm では発芽しても菌糸の生長は 200 から 400μ で止まるが，0.1 ppm 以下ではそれ以上の順調な生長が見られた。多数の休眠胞子をスポイトで集め M.G. ペプトン液で培養し発芽生長をしらべた所，1ppm 以上では全部破壊死滅し，0.6 ppm では大半が破壊され，0.1 ppm では発芽はするがその後の生長は行われなかつた。0.1 ppm 以上のものでも破壊をまぬかれた胞子は，清浄な水で洗つた後に正常の液体培地に入れると，24時間後にはすべて発芽した。

以上のことから游走子嚢形成，嚢中での游走子形成及びその放出，游走子の発芽等に対しては大体0.1 ppm 以上で阻害作用があると認められる。しかし休眠胞子は 0.1 ppm でも死なぬものがあり，これらは M.G. の影響がなくなると発芽可能であるから，実際にあたつてはこの点を考慮する必要があろう。

Table 3. The effect of malachite green on each life-stage of *S. parasitica*.

Conc. of M.G. \ life-stage	growth of mycelia (young)	growth of mycelia (whole, adult)	formation of sporangium	germination of resting spore	sporulation of sporangium	germination of Gemma	sporulation of Gemma
0.01ppm.	+	+	+	+	+	+	+
0.02	−	+	+	+	+	+	+
0.03	−	+	+	+	+	+	+
0.06	−	±	±	+	+	+	+
0.1	−	−	±	±	+	+	+
0.2	−	−	−	−	−	±	−
0.3	−	−	−	−	−	±	−
0.6	−	−	−	−	−	−	−
1.0	−	−	−	−	−	−	−
2.0	−	−	−	−	−	−	−
3.0	−	−	−	−	−	−	−

+ ; non effective.
− ; completely restrained, or lethally effective.
± ; seemed to be restrained but not sure.

第 3 表は以上の諸結果をまとめたもので，器官形成及び夫々の機能を停止させる M.G. 濃度の限界がほゞ 0.1 ppm であることが分る。

2. 高濃度のマラカイトグリーンの殺菌効果（時間と濃度との関係）。

上述の諸実験で菌糸の生長や器官形成がM.G.によつて完全に抑制されても，それは必ずしも殺菌を意味してはいないし，またM.G.液中に入れたまゝの実験結果であるから，ニジマス卵におけるように短時間処理して水生菌を防止する場合については，更に致死的な時間と濃度とについて知らなければならない。そこで比較的濃度の高いM.G.列について殺菌に必要な最低処理時間をしらべ，濃度と時間との関係について検討を加えた。

材料はすべて *S. paratisica* を用い，菌糸，游走子嚢及びワカサギ卵に着生して游走子嚢を形成しているものの三者を使用した。各濃度のM.G.水溶液中で時間を変えて菌体を処理し，とり出した後清水でよく洗つてM.G.を除き，普通の培地にうえて生長の有無，游走子放出の有無を見て致死効果を判定した。M.G.処理中の液温はいずれも17° Cで，常に3シリーズおこない，一例でも効果が無かつた場合はすべて無効と

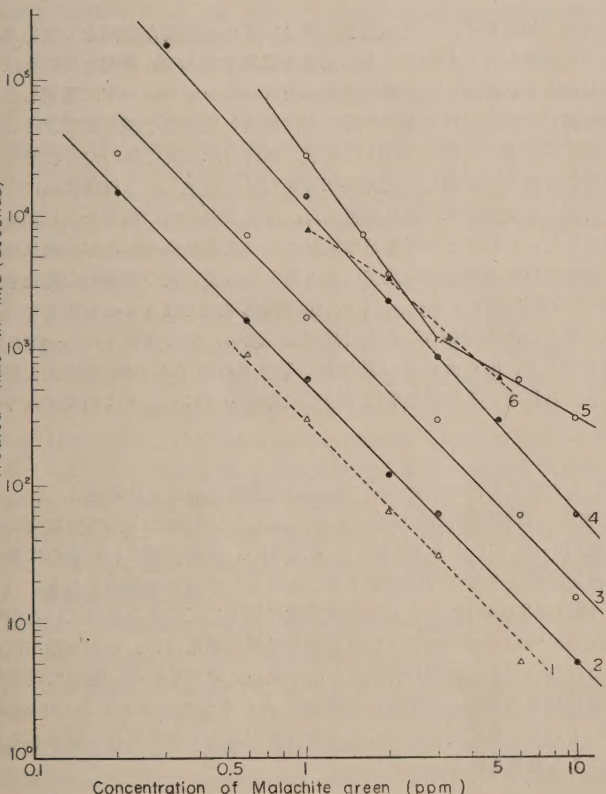


Fig. 2 The correlation curve showing the time (seconds) need to kill the *S. parasitica* in various concentration of marachite green.

1. the maximum survival limit for hyphae.
2. the minimum fatal limit for hypahe. (judged from 1 day culture after the treatment)
3. the minimum fatal limit for hyphae. (judged from after 4 day culture after the treatment)
4. the minimum fatal limit for germination of zoosporangium.
5. the minimum fatal limit for sporulation of zoosporangium.
6. the minimum fatal limit for hyphae on eggs.

して結果を出したが，誤差はかなり少なかつた。又游走子嚢については完全に無菌的（bacteria free）には出来なかつたが，菌糸については完全に無菌的に実験を行なつた。即ちM.G.処理をした後滅菌蒸溜水100ccにペニシリンナトリウム塩10万単位を溶解したものでよく洗滌し，それからペプトン平板培地上にうえると雑菌の発生は全く見られず，又水生菌に対する害も認められない。

結果はまとめて第2図に示した。図において縦軸は処理時間で，分を単位として対数にとつてあり，横軸はM.G.の濃度を ppm で対数にとつてある両対数グラフである。各濃度において生残し得た最長時間及び死滅させるに要した最短時間をとると，夫々の点は図において明らかなように殆んど直線上に並び，又各直線は大体平行となる。実際の致死限界はこの平行線の間にあると思われるが，両者の差は小さいから実用的には死滅直線を知れば良いであろう。即ちこの直線より右上の範囲のM.G.濃度及び浸漬時間で菌糸を処理

すれば確実に菌糸は死滅する。従つて生残し得る最長時間に関しては一例についてだけに止め，他はすべて死滅させるのに要する最短時間について求めた。培養一日後には生長が見られないものでも，3〜4日後には生長しはじめるものがあるが，3〜4日後の結果を取つた直線は平行に移動し，それ以後になつて生長し出すものは見られない。即ち 3〜4 日後の結果を最終的なものと見なすことが出来る。

遊走子嚢に対する殺菌効果を見るためには，無菌的に遊走子嚢を形成させた水生菌より遊走子嚢のみを解剖顕微鏡で分離し，菌糸のときと大体同様の処理操作をして蒸溜水又はペプトン液中に置き，21°C，24時間後の結果を検鏡した。前にものべたように遊走子嚢はペプトン液中ではそのまゝ発芽し，蒸溜水中で遊走子を形成し放出するが，図において蒸溜水における結果の方が少し上になつているのはこの違いのためと思われる。遊出して生じた休眠胞子の殆んどが発芽力を有することからもこのことが察せられる。

産卵直後のワカサギ卵に菌を接種して胞子嚢を形成させたものを卵ごとM.G.で上にのべたと同様の処理をしその結果を見ると，遊走子嚢の遊走子放出能力の阻害の直線と殆んど一致している。

3. 感染について

水生菌の感染については，菌糸，遊走子，休眠胞子，二次遊走子，等のいずれが主要な役割をしているものかは未だ不明である。もし菌糸によつて感染が行なわれるなら，菌糸を阻害するM.G.濃度を用いればよいが，菌糸以外の場合はより濃いものを用いる必要がある。滅菌蒸溜水を入れたシャーレの中に滅菌した麻の実を分散させ，一端にペプトン液で培養した菌糸だけのものや麻の実に寄生して遊走子嚢形成しようとしているもの（休眠胞子の混入を防ぐため）を別別に入れて 21°C に置き，無菌の麻の実に菌のつく状態をみると，菌糸だけを入れたものでは一日後には菌糸が接触した近くの麻の実だけに発生し，二日後にははじめに入れた菌体に遊走子嚢を形成し，三日後には全部の麻の実に発生した。遊走子嚢を持つ菌体を入れたものは2日後にすべての麻の実から菌が発生した。このことから菌糸の接触によつても感染は起るが，菌糸は細断されると比較的早く死滅するから，実際は殆んど遊走子を経ていると考えられる。従つて感染を防止するためには遊走子放出を阻害する濃度，即ち浸漬法では 0.2 ppm 以上，短時間処理法では 5 ppmを使用するとすれば約12分以上が推定される。実際に種々の濃度のM.G.を含む滅菌蒸溜水中に麻の実を入れ，一端に遊走子嚢を持つ菌体を入れて感染の有無を見ると，0.1 ppm では約半数に発生するが 0.2 ppm では全く感染を見なかつた。この場合でも発芽がおさえられている休眠胞子についての考慮を忘れることは出来ず，今後検討を要するものと思われる。

4. 実施上の問題

現在ニジマス卵をM.G.で処理している方法は[3]，20万分の一（5ppm）の濃度の液を1時間流している が，前記のように第2図から 5 ppm で胞子の致死時間は約12分である。但しこの実験は17°Cで行なつたもので，実際にマス卵を処理している水温（9〜15°C）より多少高いしまたM.G.が孵化槽にわたるのに要する時間なども考えると，実験から得た推定時間よりは長時間を要するであろうが20分位で充分だろう。

ウナギについては現在500万分の一（即ち0.2 ppm）になるように養鰻池に投入して効果をあげているが[4]，この濃度では菌糸を殺しても遊走子嚢などについては抑制だけで致死効果は期待出来ない。しかも池中においては微生物その他による分解も考えられるのでその効能の持続はかなり短いと考えられる。従つて病魚に対する治癒効果はあまり期待できず，病勢進展の抑制，感染防止の程度に止まるものと思われる。0.2ppm という濃度はM.G.としてはかなり濃いもので，魚に対していくらか害作用があると考えられ，病魚がそのために斃死して選別効果を生んでいることも想像される。

文　　献

1) Hoshina, T. and M. Ookubo : On a fungi-disease of eel. Jour・of Tokyo Univ・Fish. 2(1) 1956.

2) 新崎盛敏・野沢洽治・三宅　真： 病原性水生糸状菌の生理生態に関する研究ーI. 本誌前号

3) Burrows, R. E. : Prophylatic treatment for control of fungus (*Saprolegnia parasitica*) of Salmon eggs. Prog. Fish. Cult. 11(2): 97〜103. 1949.

4) 静岡県水試浜名湖分場： 鰻のワタカムリ病に対するマラカイトグリーンの治療効果について. パンフレット 1956.

除藻剤 Delrad について

新崎盛敏・野沢洽治
(東京大学農学部水産植物教室)

On the algicide Delrad 70

Seibin ARASAKI and Koji NOZAWA

The algicidal efficiency of Delrad 70, an algicide prepared at Herculus Powder Co. U. S. A., was tested on some fresh-water algae and a water plant, including *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Oedogonium*, *Microcystis*, *Oscillatoria* and *Hydrilla*. The efficiency of the toxicant was determined by mannonmetric method from the rate of photosynthetic activity or by macroscopic observation on change of color and sedimentation of the algal cells.

The results obtained were as follows:

(1) The valid concentration of the Delrad 70 varied from 0.1 to 1.0 ppm. according to kind of algae or their population dencity. It was also harmful to the gold-fish in almost the same concentration as to the algae. In dense culture of algae, the efficiency decreased probably due to the influence of adsorption to the algal cells. (Fig. 1, 2, 3, and Table I, II)

(2) The adsorption degree of the Delrad 70, or the decrease of toxic efficiency was great in the existence of mucous excreta of gold-fish or in dense population of *Scenedesmus*, but not so great in Kaoline suspension. (Fig. 4, 5)

養魚池，貯水池，其の他の河川湖沼等では，往々単細胞または糸状の下等藻類が大発生し，その駆除に大いに悩まされることがある。従来は単にこれを人力で取り除いたり，或は硫酸銅[1]亜硫酸[1)2)]石灰等の毒物を使つて駆除しようとの試みがあり，最近では2-4-D等[2)3)4)]も試験されているが，まだ強力適切な方法はないと云つても過言ではない。最近藻類に対して撰的択に効果があるとされる殺藻剤 (algicide) "Delrad" を入手したので，その殺藻効力また藻に対する作用機序等について調べた。

Delrad は説明書によると dehydroabiethyl-amine acetate を主成分とすると云い，市販品は有効成分含量 70%のペースト状の Delrad 70 と有効成分含量 50% の液状の Delrad 50 とがあるが，筆者等は Delrad 70 を使用して種々の淡水藻類に対する影響をしらべた。その結果これまでに知られているものとは多少異なる作用機構が見られ，なお今後研究を進めなければならない部面も多いが，これまでに得られたところを第一報として報ずる。試薬を提供された Herculus 会社，高田孝雄氏に深謝する。

1. 材料及び実験方法

Delrad の作用の概観を得るために先づ種々の藻類および水草について肉眼的または顕微鏡による観察を行い，次に検圧法によつてその殺藻機構を種々検討した。

はじめの実験には Delrad 70, 1g を計量しこれを蒸溜水 1Lに溶解したものを原液とし，Delrad の濃度が 10, 1.0, 0.1, 0.01ppm になるようにうすめて実験した。試液は *Microcystis, Scenedesmus, Chlorella* 等が濃厚に発生している池水を適当に稀釈し，同時に *Oedogonium, Hydrilla* を入れて置いた。

検圧法には主として *Scenedesmus* を用いワールブルグ検圧器で同化作用による酸素排出量を測定した。即ち重炭酸緩衝液を加えた Knop 液に *Scenedesmus* を約 50mg/L の濃度に懸濁させたもの 5ml を主室に入れ，側室には混合後目的濃度となるように調製した Delrad 液 0.3ml を入れ，25°C に於て 300W スポットライトを約 30cm の距離から当てゝ，Delrad 添加前後の酸素排出量を測定検討した。この条件に於ては Delrad を加えないときに数時間にわたつて一定量の同化を示し，その他の実験上の誤差も認められなかつた。

2. 殺藻作用の概観

肉眼的観察に於て，有効濃度では藻体は沈下しやがて白くなつて枯死する。この沈下して水が澄むまでの時間は薬剤の濃い時は約 30 分で，大体微少藻類と同じ位の大きさと密度をもつた粒子が約 20cm の水中を

1957 年 9 月 6 日 受理

Table 1. Rate of efficiency of Delrad 70 fluctuated in three experiment series which differ from eaeh other in population density of algae and in nature of water.

ppm	0.01	0.1	1.0	10.0
Microcystis	−	−	±	+
Scenedesmus	−	±	+	+
Chlorella	−	±	+	+
Oedogonium	−	−	−	+
Hydrilla	−	−	−	+
Microsystis	−	−	−	±
Scenedesmus	−	−	±	+
Chlorella	−	−	±	+
Oedogonium	−	−	−	±
Hydrilla	−	−	−	−
Microcystis	−	−	−	−
Scenedesmus	−	−	−	±
Chloreella	−	−	−	−
Oedogonium	−	−	−	−
Hydrilla	−	−	−	−

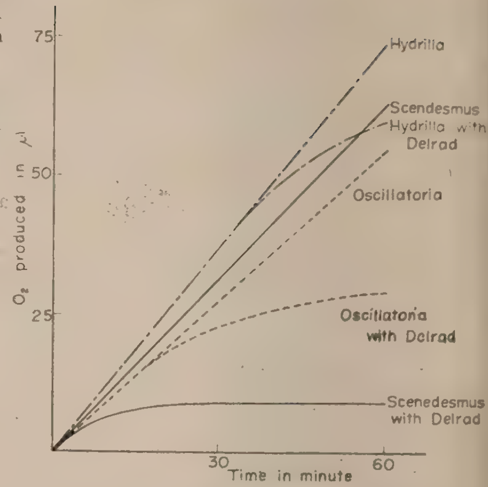


Fig. 1 Rate of photosyntesis of *Hydrilla*, *Scenedesmus* and *Oscillatoria* in the presence or absence of Delrad

沈下するに要する充分な時間もほぼ 30 分位であるから，薬剤投入後直ちに作用したものと考えることが出来る。薬剤濃度の稀薄な場合は完全に沈下するのに数時間からまる 1 日かゝり，白化するのも除々である。更に稀薄したものでは一部分だけが沈下するだけで他は懸濁を続け効果は不充分である。

第 1 表に示したものは 1 日後の肉眼的観察で白化枯死したものを効果有り（+）としたものである。実験例による変動は非常に大きいが，各例に於ける種別の抵抗性の強弱の序列はいづれの場合も同様な傾向である。即ち *Scenedesmus, Chlorella* 等に対してもつとも殺藻力強く，*Microcystis, Oedogcnium, Hydrilla* の順に弱かつた。このことは後に行つた検圧法による実験に於ても認められた（第 1 図）。実験例によつて有効濃度が変動する原因については後にのべるように殺藻機構に吸着が関与しているためと思われる。

薬剤の作用を受けた藻体を顕微鏡下に観察すると，*Scenedesmus, Chlorella* 等では液胞が大きくなつているが *Oedogonium* では原形質が収縮しており，死に方にも相違が見られる。然しいづれの場合も藻体は白くなつて葉緑素が破壊されており，当然同化作用も阻害を受けているものと考えられた。

3. 同化作用阻害

Scenedesmus 懸濁液に Delrad を加えて酸素の排出量の変化を見ると第 2 図に見られるように濃度が低くなるに従つて酸素の排出が停止するまでの時間が長くなり，ついには停止せずに排出量が減少するだけとなる。又 2.4. D のときのように一時的に同化作用を促進するような現象は全く見られない。

一方 1 ppm 及び 10 ppm の Delrad で 30 分間処理して酸素排出が完全に停止した *Scenedesmus* を数回蒸溜水で洗滌して普通水にもどすとしばらくはいづれも全く回復が認められないが， 1 ppm で処理したもの

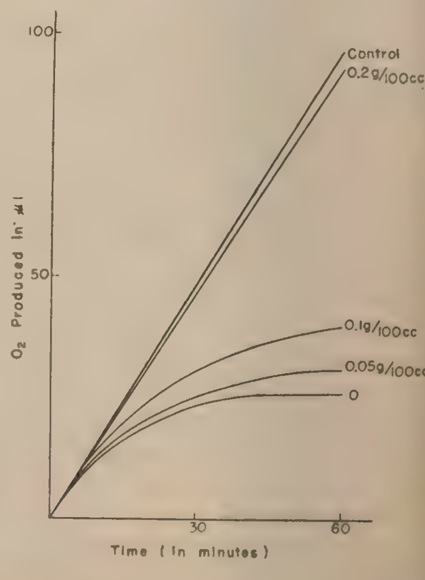


Fig. 2 Rate of photosynthesis of *Scenedesmus* at different concentration of Delrad

だけは1日後にほぼ完全に常態に回復したけれども 10 ppm のは回復しなかつた。

このような阻害の仕方は Delrad の殺藻作用が2-4-Dのような植物ホルモンとは勿論異なり，又青酸等が光合成に対して行う阻害の状態とも阻害のあらわれ方，或は阻害回復の仕方などに於て明らかにおもむきを異にしている。

4. 撰択的吸着

同化阻害の実験に於て光飽和の条件内で薬剤の濃度は同じでも *Scenedesmus* の密度が高くなると阻害が低下する現象がある。第3図は種々の密度の *Scenedesmus* 懸濁液における 1ppm の Delrad の阻害であるが，70 mg/L 附近の密度では 100％ の阻害を示すが，更に濃密になると急に阻害が低下する。

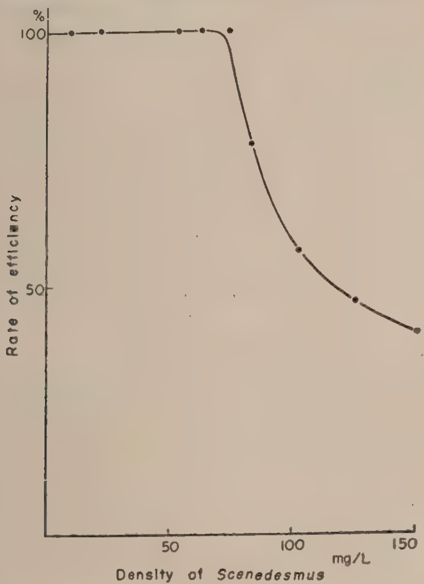


Fig. 3 Correlation between Density of *Scenedesmus* and efficiency of Delrad 70. It shows that 1.0 ppm. of Delrad 70 check completely the photosynthesis in lower density of *Scenedesmus*, but not so completely in higher one.

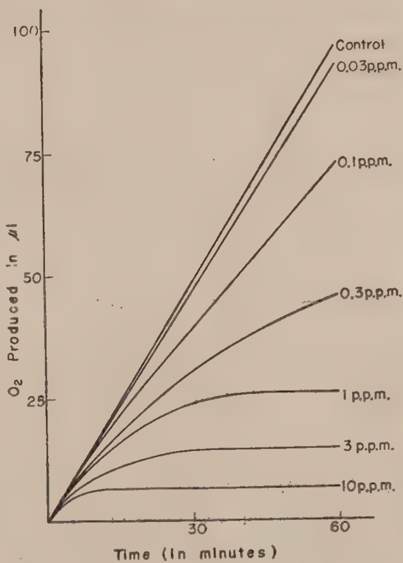


Fig. 4 Changes in efficiency of Delrad 70 against the photosynthetic intensity of *Scenedesmus* in the presence of kaoline of various concentration.

そこで *Scenedesmus* の密度を大にするかわりに充分に水和させたカオリンを加えることによつて Delrad の阻害作用が低下するかどうかを見ると，カオリンが少量の時は殆んど影響なく， 0.2g/100cc と云う多量を加えた時にはじめて多少の阻害抑制が見られる（第4図)。

一方金魚を飼育している水で *Scenedesmus* 懸濁液を作りこれに Delrad を加えると 10 ppm でも殆んど生育は阻害されぬ（第5図)。しかしこの水に 2〜3 日通気すると次第に阻害があらわれ抑制作用が弱まつて来る。又強く抑制されているものでもそれを遠心沈澱し前記 Knop 液に懸濁させて Delrad を加えると前の実験同様の阻害を現わす。これ等の結果から魚の体表から分泌される粘質等が Delrad による阻害の抑制に非常に関与しているものと考えられる。

以上のように Delrad の作用が，*Scenedesmus* の高密度，カオリンの添加，魚から分泌される粘質等によつて抑制されることから， Delrad は非常に吸着性が強く， はじめ植物体表に吸着蓄積されることが推定される。粘質に関してはそれが植物体表を保護することも考えられるが，高密度における阻害抑制，粘質による阻害抑制が Knop 液中で直ちになくなることなどから直接粘質に吸着するものと考えられる。又カオリンと粘質との抑制作用の相異に見られように，その吸着は非常に顕著な撰択性があり，これが撰択的殺藻作用を示す一つの要因であろう。

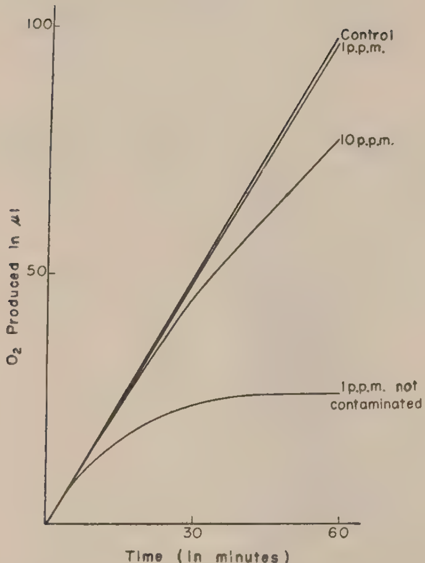


Fig. 5 Changes in efficiency of Delrad 70 against the photosynthetic intensity of *Scenedesmus* in contaminated water with excreta.

Table. 2 Decrease of efficiency of Delrad 70 against gold fish with the lapse of time. It shows that the fish was killed in a day in fresh or 5 day-passed solution of 10–50ppm. in fresh soluion of 1 ppm the fish was killed after 4 days, but in the same solution elapsed 2–5 days the fish was not killed.

conc. of Delrad 70 (ppm) \ days	1	2	3	4	5
50	+				
		+			
			+		
				+	
					+
10.	+				
		+			
			+		
				+	
					+
5	+				
		±	+		
			±	+	
				±	+
					±
1	−	−	±	+	
		−	−	−	±
			−	−	−
				−	−
					−

はじめの実験に於て変動が大であつたのも供試藻体量や稀釈度が不定であつたためと考えられる。

5. 自然分解

前の阻害回復の実験に於て洗滌直後には薬剤が植物体に吸着されていて回復が見られなかつたものが，1日後に回復すると云うことは，植物が抵抗性を得たため，或は吸着したものが溶出したため，分解して薬効を失つたため等の原因が考えられる。そこで 1ppm 溶液に入れたまゝにして置くとやはり1日後にはほぼ常態に回復し溶出ではないことが分る。次にこれを遠心沈澱し新しい 1 ppm 溶液に入れると再び阻害があらわれ，そのまゝ放置して置くと翌日には回復する。この回復は明らかに Delrad が分解したためのものであることを示している。蒸溜水に溶解した貯蔵原液は 2 週間後も殆んど効力が低下せず，また2ケ月後も薬効を充分に有しているが，池水に溶解して作つた貯蔵液は5乃至7日で効力を失う。これは Delrad の分解が天然に於ては主として生物的に行なわれ，それは可成り早いものであると考えられる。

6. 魚類に対する影響

魚に対する害作用について，当才の体長 5cm 前後の和金を用い，50, 10, 5, 1ppm の各濃度に飼育してしらべて見た。その結果は 50ppm で 1〜2 時間，10 ppm で約1日，1ppm でも 4〜5 日で死ぬ。*Scenedesmus* の発生している水中ではむしろ金魚に対して強く害があらわれ *Scenedesmus* への薬効は抑制される。調整後5日経過したものでも 5ppm 以上ではすべて死に，1ppm でも2日経過しなければ完全に害が無くなるとは云えない（第2表）。従つて魚に対しては相当強い害作用がありしかもより撰択的であると思われる。死んだ魚はすべて全身に白い膜を被つたようになつている。

7. Delrad の殺藻機構

以上の諸結果より Delrad の殺藻機構を光合成反応の点から考えると，阻害の回復は直ちにはあらわれないが（これは吸着のためであろう），薬剤の影響が無くなれば回復するのであるから主として化学反応に対して阻害的に作用して居り，阻害が時間とともに強くなる（第2図）点からいくつかの代謝系に作用していると考えられる。藻体の白化することから直接葉緑素が破壊されて光化学反応に作用するように思えるがそれは間接的なものであろう。従つて殺藻作用は光の有無強弱に無関係であり温度の高低に関係あると考えられる。殺藻作用の撰択性については主として非常に特徴的な撰択吸着によるものであろう。

実用に際しては自然分解が行なわれ毒性の蓄積の恐れは少なく，使い方によつては有効なこともあるであろう。

が魚に対しては低濃度でも害作用が考えられるから，魚類の棲息するような所で使用する事は注意を要するものと考える。

文　　献

(1) Surber, E. W; Chemical control agents and their effects on fish. Prog. Fish-Cult **10** : 125-131 1948.

(2) Bauman, A.C.: 2-4-D and some emergent aguatic. Prog. Fish-Cult. **9**:71-77. 1947

(3) Surber, F.W., C.E. Minarik and W.B Ennis : The control of aquatic plants with phenoxyacetic compounds. Prog. Fish-Cult. **9** : 143-160. 1947

(4) Snow, J. R.: Control of pond weeds with 2-4-D. Prog. Fish-Cult. **11**: 105～108. 1949

アサクサノリ果胞子の着生機構とその胞子付け装置（方法）に就て

田 中 小 治 郎
（香川県水産試験場）

Studies on the attaching mechanism of carpospore of *Porphyra tenera* and the spore collecting method.

Kojiro TANAKA

The present study was carried out to make clear the attaching mechanism of tbe carpospore of *Porphyra tenera* and to bfind out more favorable spore-collecting method in the laver field.

Oyster shells were set in the laver field as the carpospore collecters in tow different ways. 1) Oyster shells were piled up about 42 cm in height in an opened tank set on the bottom. 2) Oyster shells were hung horizontally by an iron wire about 15–30 cm over the bottom. The result may be sumarized as follows.

1) More conchocelis were found on the shells piled up in the tank than those hung horizontally in the sea.
2) There were scarcely any difference in the number of conchocelis betwen the shells of upper, middle, and lower part on the shell-pile.
3) The vortex or stagnation of the tidal current caused in the apparatus have influence on, accumulation of follen leaves, and consequently the accumulation of carpospores on the oyster shell. Under favorable conditions many conchocelis were found on the shell as a result of the attach ment of numerous carpospores.

アサノクノリ（*Porphyra tenera*）の越夏糸状体からの単胞子の多量出現を予察するためには，水温，比重の観測と共に気象，潮汐の関係を考慮して，海水の上下層の攪乱を知る必要があるとされ，斎藤[2]等は1956年に海水の上下層攪乱，成層に不安定を生じた頃に，胞子の多量出現することが確認されたと報じている。これは糸状体からの単胞子と海況との相関について論じたもので，果胞子に就ては行われていない。

しかしアサクサノリの果胞子が基質用のカキ殻内に侵入するまでに，単胞子における場合とは異つた海況の影響をうけると思われる。果胞子の植物体からの放出には海況の影響はより少い様に思われ，果胞子が基質に附着する量の濃淡はむしろ海流によるいわゆる「落ノリ」の集積の多寡に強く支配されるものではないだろうか。

筆者は胞子付け装置の構造によつて海流に違いを生じ，それに伴つて果胞子の集積量に多寡が生ずるであろうということに着想し，このような課題の解明に努めた。よつて同学者並びに当業者の参考に資するためその結果の概略をいまこゝに報告する次第である。

この実験は香川県丸亀市土器川裾のノリ養殖場で行われた。試験の装置は昭和32年（1957）2月10日建込まれ，調査は昭和32年5月28日に行われた。その方法はアサクサノリ胞子付け用の基質に用いられたイタボガキ（*Ostrea densellamelosa*）貝殻の内面にアサクサノリ糸状体が侵入している区域の面積をプラニメーターを用いて測定した。

この試験に用いられた装置に二つの方式がある。筆者は説明の便宜上水平式胞子付け装置と，水槽式胞子付け装置と名付けた。

ところで第一の装置の構造は浮動距離約 60cm を示すいわゆる浮動式アサクサノリ養成棚の下方，地盤上約 30～15cm の位置に針金を通したイタボガキ貝殻を水平に取り着けたもので，その数量は長さ 90cm の一本の針金に約60枚である。

1957 年 10 月 17 日受理

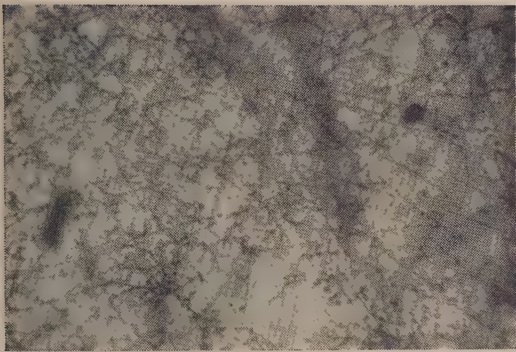


Fig. 1 The filamentous thalli of *Porphyra tenera* kjellman originating from carpospores, penetrated in to the inner layer of a oyster-shell (*Ostrea densellamelosa*).

一方水槽式の構造は直径高さ夫々 70×60 cmのコンクリート製水槽中に約1,000枚のイタボガキ貝殻を高さ42cm 程度で収容し，網目2分の金網をもつて覆つた。その水槽中には生長したアサクサノリの附着している長さ約 40cm の割竹ヒビ4～5本を水平式に張られた網ヒビの水位とほぼ同じ位置に保つように収容した。

本年度（1957）はこの海苔養殖場で乾ノリが約70万枚収獲されたといわれるから従来見られなかつた大量の「落ノリ」が生じたことは想像に難くないであろう。

一方カキ殻内にアサクサノリ糸状体が侵入している区域の調査方法としては，上記の各装置から無作為標本抽出によつてカキ殻50枚を抽出し，カキ殻内に，はびこつている糸状体の棲息面積を測定した。この際カキ殻の色彩が肉眼で赤紫色又は黒色を呈している部位を測定したので糸状体の生長が遅れているとか，密度が淡いとか等で肉眼で，はつきりしない個所は除外されている。かようにして測定された部位の糸状体の成長の状況は Fig. 1 に示す通りである。

又このように糸状体が侵入している貝殻内の面積を測定した結果は Table. 1 の通りである。

これによつて糸状体の棲息面積の百分率を比較すると15.3～19.7%の差で水槽式の方が水平式より優つていることが窺われる。なお貝殻の大きさ別にみると 4,000～5,000 mm² では，水槽の方が水平式より，はるかに優つているように思われる。

以上述べた装置別のアサクサノリ糸状体の棲測息面積の定結果から，装置によつて胞子の附着，糸状体の生長に優劣の生ずる原因について少しく考察してみよう。

筆者はこの目的のために前述の各装置を設置した土器川裾において昭和32年6月3日に潮流の垂直的変化を知るため観測を行つた。その際の流速，流向の状況は Table. 2 及び Fig. 2 に示す通りである。この際の流速観測は水深 174cm を示す 13時5分から始め，13時55分には水深 194cm，流速 2.03m/min を示し，湛え状況に達した。それから漸次退潮が始まり水深 124cmを示した時表層における流速は 5.75 m/min が観測された。そこで水槽の表面近い位置で流速を測定したところ 3.24 m/min，同時に水槽の片側で表面より水深33cmの位置で流速

Table 1. Area where the *Conchocellis* of *Porphyra tenera* has penetrated into the inner layer of oyster-shell in two collecting apparatus of carpospores.

Size of shell	(A) Shells are piled up in the tank				(B) Shells are hung horizontally by a steel wire.				Difference of percentage (A)−(B)
	Number of shells observed	Os	Cs	Cs/Os ×100	Number of shells observed	Os	Cs	Cs/Os	
mm²		mm²	mm²	%		mm²	mm²	%	%
3,000～4,000	14	3,674	3,122	84.9	22	3,518	2,461	69.6	15.3
4,000～5,000	23	4,454	3,804	84.4	9	4,466	2,892	64.7	19.7
5,000～6,000	11	5,505	4,435	80.5	11	5,415	3,483	64.3	16.7
Total number	48	—	—	—	42	—	—	—	—

Table. 2 Velocity of tidal current in the laver-field near Marugame Kagawa Pref. (1957. Jun. 3)

Time h m	Water depth cm	Direction	Velosity of Metre/min
13—05	174	—	—
13—35	189	WNW	0.60
13—55	194	NNW	2.03
14—05	193	—	—
14—35	192	W	0
15—05	187	W	0.47
15—35	173	NW	1.35
16—05	153	NW/N	2.70
16—35	124	N/W	5.75
17—05	9.0	N/W	1.49

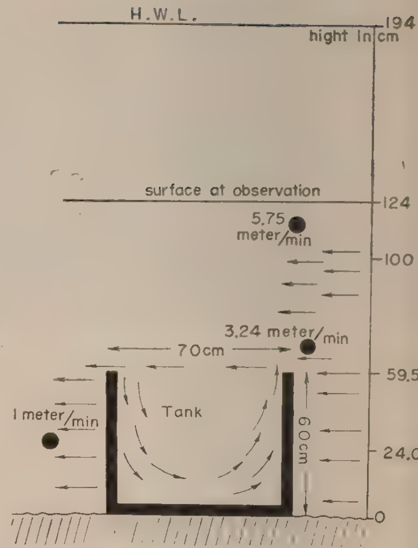


Fig. 2 Diagram of the currert around or in the tank set in the sea.

1 m/min. であることが判明した。

このように流速の変化がみられたのであるが水槽内の流速，流向などの変化状況を調べるために予め準備しておいた鋸屑を水槽の位置より約 7 m離れたところに数回投入し，これらの鋸屑が水槽の表面に達した場合の流速，流向の変化状況を目測により観察したところ鋸屑が水槽の表面に流れつくと，速度が落ちて，水槽内へ流れ込み，浮游する状況が認められ，鋸屑の一部は水槽の底に向つて浮いたり沈んだりし，その浮游経路は曲線を描きながら漸次再び水槽の上層へ浮上し，遂には水槽外に流出するのが認められた。

一方たまたま小さな砂粒に附着した海藻がこの水槽内に流れ着くと，暫くしてその流れが止まり，水槽の底に真直ぐに沈下することが認められた。その外比重の軽い海藻の切片が水槽内に流れ着くと，槽内で廻転しながら水槽の底に落ち付くものがみられた。

以上説明したような観測結果をもつて推測するに，水槽内の水流は潮の流れによつて滞流或は渦流の生じていることが推察出来る。ノリ養殖期に生じた「落ノリ」や果胞子がこのような潮汐流によつて水槽内に流れ着いた場合，この槽内にあるカキ殻約 1,000 枚によつて作られた各層の間隙によつて集積され，水槽外への流出は大部分防がれ果胞子を離脱させると思われる。なおあらかじめ生育したノリをこの槽内に挿入してあるので，そのノリが充分生長した場合，これらの果胞子も離脱する。これらの果胞子が槽内の滞流や渦流により多数の流出をまぬがれ，こゝに多量集積して直ちにか，数日以内とかに附着するものかと思われる。

なお印象的観察によつても水槽中に積み重ねられたカキ殻の高さ約 42cm の場合には，カキ殻内に沈着する果胞子数とカキ殻の各層の高さの相異とには殆ど相関がないように思われる。然し水槽の高さ例えば約 50 cm 以上の高さにカキ殻が積み重ねられた場合などについては他日の研究にまたねばならない。

又これとは反対に水平式胞子付装置では，滞流，渦流現象が，水槽式に比較して強くないので恐らく「落ノリ」或は果胞子などの集積が比較的少い結果，その果胞子の附着が水槽式に劣るのではあるまいか。いずれにしても果胞子の附着の濃淡は潮汐流の滞流と渦流とに影響されることを認めざるを得ないと思う。

終りに臨み本研究に当り東海区水産研究所須藤俊造博士，丸山武男技官より，取纒めに助言を与えられたことに対し，高杉輝雄技師及び満岡弘氏より実験に支援を与えられたことに対し，今こゝに記して厚く御礼を申し上げる。

摘　　要

本研究はアサクサノリ果胞子の着生機構と胞子付け装置について行われたのであるがその結果は次の通り

である。

1.　胞子付け装置によつて生ずる潮流の滞流又は渦流の条件がアサクサノリの落葉，いわゆる「落ノリ」の集積に影響を及ぼし，好条件ではカキ殻内の果胞子の附着が濃密となる。

2.　水槽式胞子付け装置は水平式胞子付け装置よりも優れていることが認められた。

3.　水槽中に積み重ねられたカキ殻の高さ約 42cm の場合にはカキ殻内に沈着する果胞子数とカキ殻の各層の高さとには殆ど相関がないように思われる。

文　　献

1)　斎藤雄之助：　本誌，**21** (4)，1955.

2)　新崎盛敏，藤山虎也，斎藤雄之助：　本誌，**22** (3)，1956.

3)　殖田三郎：　海苔養殖読本，78，昭和27 (1952).

4)　黒木宗尚：　アマノリ類の生活史の研究　第1報，黒胞子の発芽と生長，東北海区水産研究所研究報告，第2号，79 (1953).

トロール網模型実験

本 多 勝 司
(東京水産大学)

A Model Experiment for Trawl Nets

KATSUJI HONDA

Behaviours of two trawl nets of different size (Fig. 1) were studied in a model scale, in one case each net being kept stationary on the bottom against the water current applied, and in the other each net being dragged in still water (Fig. 2).

State of deformation of the' nets and water resistance acting on them were observed under the influence of a variety of the dragging speed, the currrent velocity, and the interval between the hand ropes (Figs. 3–6).

Head rope 120尺（網Ｉ）と 128 尺（網Ⅱ）(Fig. 1) の２種のトロール網を底を静止して，流れに当てるばあいと，静水中を曳網するばあいについて，流速を変えて，Hand rope の間隔に対する網成り，流水抵抗等を観測した。

網を曳行するには Fig 2 のように流れと等速で Canvas 製の底を移動した。

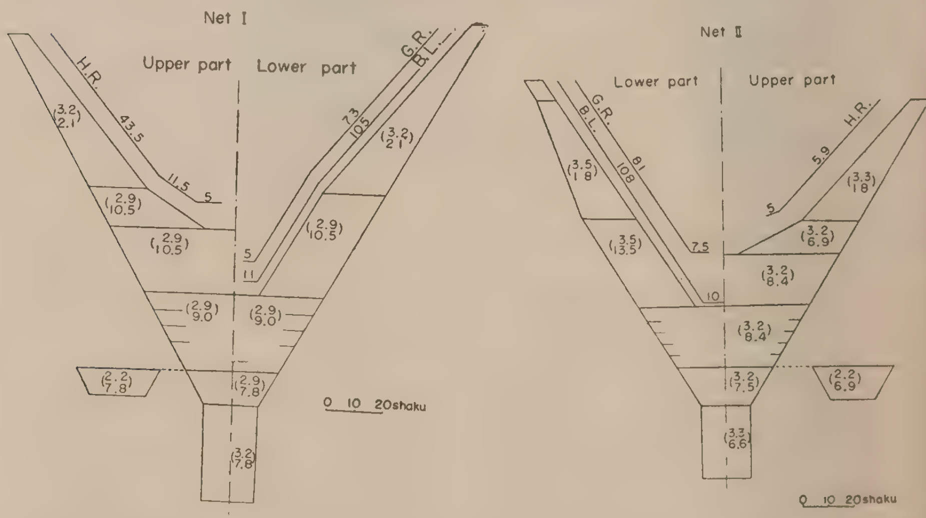


Fig. 1. Construction of the trawl nets.

Upper and lower numerals in bracket indicate diameter of netting twine (mm.) and mesh size (cm.) respectively. Other ones show length in *Shaku* (≒30cm.).

実物網の網地は網Ｉにはマニラトワイン(比重 $\rho''=1.41$), 網Ⅱは塩化ビニリデン($\rho''=1.71$) で模型網では網Ｉにはナイロン糸 ($\rho'=1.14$), 網Ⅱには絹糸 ($\rho'=1.23$) を用いた。模型網は田内博士[1] の比較法則に従い，１)模型網と実物網の大きさを夫々 λ', λ'' とし，その比は網Ｉ，Ⅱ，とも $\lambda'/\lambda''=1/70$ とし，２)模型網と実物網の網糸の太さおよび網目の大きさを夫々 D', D''; L', L'' とし $D'/D''=L'/L''$ は網Ｉで. 094 網で,. 11 とした。３) 模型網と実物網における流速を夫々 v', v'' とすると v'/v'' は網Ｉで . 18, 網Ⅱで,. 28となる。４)，模型網の綱にはなるべく細いものを用いた。５) 模型網と実物網の浮力を夫々 F',

1957 年 11 月 12 日受理

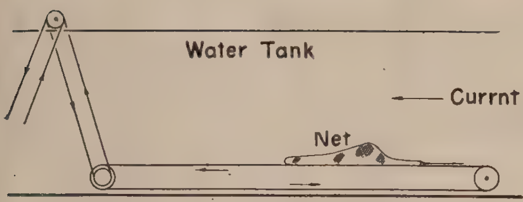


Fig. 2 Apparatus used for dragging the nets.

F''とするとF'/F''は網Ⅰで6.9×10^{-6}網Ⅱで 16.6×10^{-6}となる。模型網および実物網の抵抗及び沈降力を夫々 R', R''; W', W''とするとその比もこれに従う。

Hand ropeの長さは網Ⅰで 52m (実物換算以下之に従う), 網Ⅱで 35m として, Hand rope の間隔を網Ⅰで 55, 51, 48, 44m, 網Ⅱで 50, 45, 35mについて観測した。

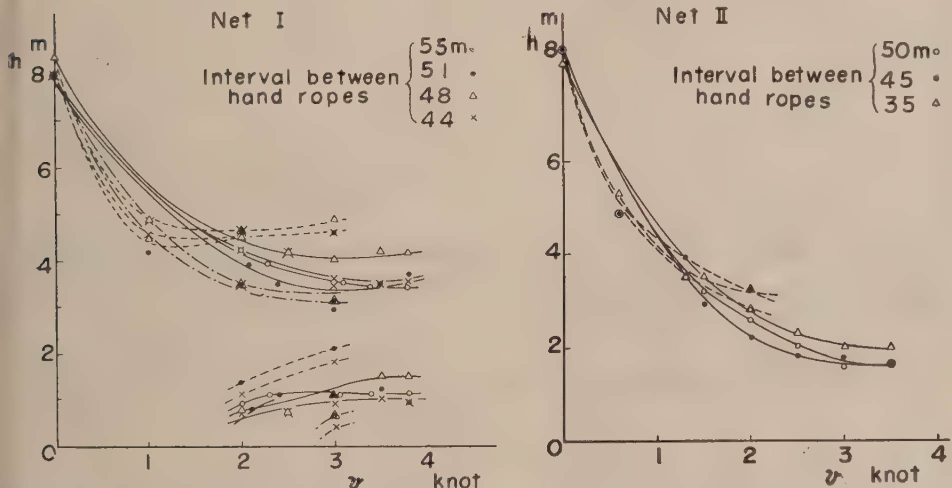


Fig. 3. The heights of head rope (h) and ground rope shown for various velocities (v). ………, when the net is dragged : —•—•—, when the weight of ground rope increases by 50% : Common marks are used throughout Figs. 3～6.

Head rope 及び Ground rope の中央の点の底からの高さは Fig. 3 の如くで両網とも流速の増すにつれて, 急激に網口が低くなるが, 2.5浬/時 を越すと余り変らない。網Ⅱでは Hand rope の間隔の狭いほど網口が高く, 2浬/時以上では, 曳行する場合は流水中に静止するばあいにくらべて, 網口が高い。網Ⅰは上下に不安定で, 流水中に静止するばあい 2浬/時 で Ground rope が浮上し, 曳行のばあい浮上は一層甚しいが, それにも拘らず網口の高さは違わない。試みに Grouud rope の重さを5割増すと 2.5浬/時までは網

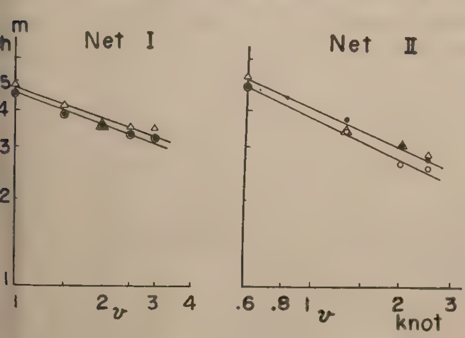


Fig. 4. The relation between h and v(see, Fig 3).

Table 1. Values of K_1 and n'

Interval between hand ropes m	Net Ⅰ K_1	Net Ⅰ n'	Net Ⅱ K_1	Net Ⅱ n'
35			4.3	−.42
44	*4.6	*−.33		
45			4.2	−.41
48	*4.9	*−.34		
50			3.9	−.42
51	*4.6	*−.33		

* (Tabs. 1—4)……When the weight of ground rope was increased by 50%

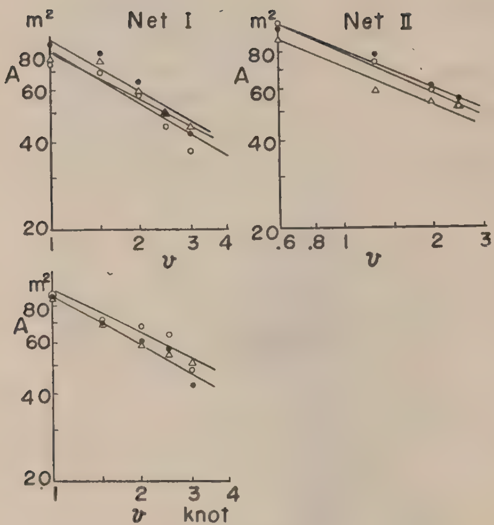


Fig. 5 The relation between A (area of net mouth) and v.

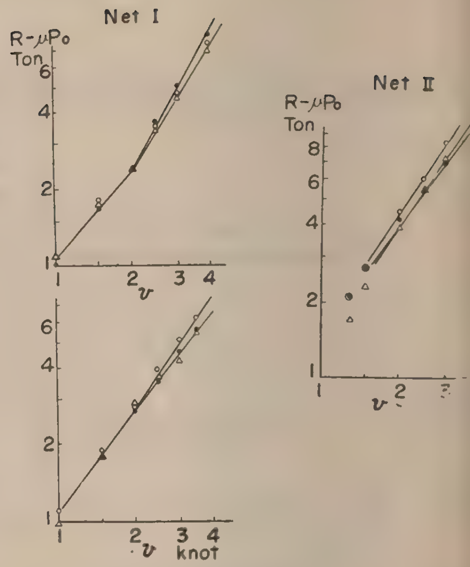


Fig. 6. The relation between $R\text{-}\mu P_0$ and v. R', force needed to drag a net : μ, kinetic frictional coefficient : P, normal pressure due to the net in water.

底に止めることができた。

速さ v で曳行するばあいの網口の高さを h とすると Fig. 4 の如くで，これを $h=K_1 v^{n'}$ であらわすと K_1 と n' とは Table 1 の如くで，n' が網Ｉで－.33，網Ⅱで－.42 ぐらいになる。

速さ v で曳行するばあいの両袖間隔を b とすると，網口面積 A は $A \backsim bh$ で，Fig. 5 の如くで，これを $A=K_2 v^n$ であらわすと Table 2 のようで，n が網 Ｉで－.51，網Ⅱで－.44 ぐらいになる。

網に仂く流水抵抗 γ は

$$\gamma=1/2\ C_f \cdot \rho \cdot F \cdot (D/L)\lambda^2 v^2$$

C_f は抗力係数，ρ は流体の密度，D と L とはそれぞれ糸の直径と脚の長さ，λ は網の寸法で，F は網成に伴う両脚の開きと流れに対する傾きとによる函数で一つの仕立については v^n に比例するものとみてよい。したがつて一つの網については，

$$\gamma=K_3 v^{2+n}$$

とかける。

曳行するばあいにはこれに摩擦力が加わる。動摩擦係数を μ，法圧力を P とすると，P は水中における総重量と揚力の差であり，揚力は γ と同様な考えから $K_4 v^{2+n}$ とかける

Table 2. Values of K_2 and n

Interval between hand ropes m	Net I		Net Ⅱ	
	K_2	n	K_2	n
35			71	−.42
44	80 *86	−.53 −*.53		
45			80	−4.2
48	90 *86	−.57 *−.53		
50			79	−4.5
51	81 *90	−.57 *−.48		

Tabel 3. The relation between current velocity and frictional force for various separation of hand ropes

Net I

Interval between hand ropes m	Current velocity 1.0	2.0	3.0 Knot
	ton		
51	.9 *1.5	.6 *1.3	.2 *.6
48	.8 *1.4	.6 *1.5	.4 *.7
44	1.1 *1.4	.6 *1.6	.4 *.9

Net Ⅱ

Interval between hand ropes m	Current velocity .6	1.3	2.0 Knot
50	2.5 ton	1.9	1.4
45	2.0	1.8	1.6
35	2.0	1.7	1.2

Tabel 4. Values of K_5 and $2+n$

Interval between hand ropes m	Net 1			Net II		
	K_5	$2+n$	n	K_5	$2+n$	n
35				1.3	1.54	−.46
44	.78 *.90	1.59 *1.40	−.41 *−.60			
45				1.5	1.34	−.65
48	.68 *1.1	1.76 *1.30	−.24 *−.70			
50				1.4	1.56	−.44
51	.78 *.98	1.61 *1.47	−.59 *−.53			

ので，

$$P=P_0-K_4v^{2+n}$$

摩擦力は $\mu P=\mu\ (P_0-K_4\ v^{2+n})$ したがつて

曳行に要する力は

$$R=r+\mu P=\ (K_3-\mu K_4)\ v^{2+n}+\mu P_0$$

$$=K_5v^{2+n}+\mu P_0$$

とかける。

摩擦力は網を曳行するに要する力と流水中に網を支えるに要する力との差であつて μP_0 は速さが 0 に近ずいた極限値として示されるので，測定の結果では Table 3 のように網Iでは I 屯，Ground rope の重さを5割増せば 1.5 屯，網IIでは 2.2 屯位である。従つて $R-\mu P_0$ を求めると，これと v との関係は Fig. 6 の如くで K_5 と $2+n$ は Table 4 のようになる。

終りに論文の御校閲並に実験の御指導を賜つた本学名誉教授田内森三郎博士並びに実験を手伝つて下さつた小野彰夫，丸山哲夫，瀬沼忠男の諸君に深謝する。

参 考 文 献

1) M. Tauti. Bull. Jap. Soc. Sci. 3(4). 1934

漁網の色に関する研究—I.
魚群の網目通過状況に関する予備実験

神 田 献 二・小 池 篤
(東 京 水 産 大 学)

The Study on the Colour of Fishing Net-1.
Observations on the Passage of Fishes through a Coloured Net.

Kenji KANDA and Atushi KOIKE

1. As seen from the behaviour of fish schools studied, *Trachurus trachurus* (LINNÉ), *Atherion elymus* (J. & S.), and *Cyprinus carpio* (LINNÉ), the fish barring effect of a coloured net decreased almost always in the following order: red > yellow > green, while black, gray, and white produced different effects on fishes, if the latter were of different species (Table 2, Fig. 2).

2. The number of fish which passed through the net, red, yollow, or green coloured, respectively, does not vary with the intensity but seems to depend on the wave length of the light reflected by the net (Fig. 4).

3. Fishes behaved differently even to the nets of the same colour if the light source was made different (Table 2).

4. The present results may not entirely be free from the colour contrast due to the simultaneous use of differently coloured nets.

§ 1. 緒 論

従来漁網の染色は第一義的に防腐を目的として行われて来た為，網地の色彩は必然的に防腐染料の色彩によつて決めめられる結果となつた。近時合成繊維の普及にともない防腐の為の染網の必要が無くなつたので網地は任意の色彩に染色出来るようになつた。従つて漁獲性能を高めるために漁網の色彩に考慮を払うことは漁業の種類によつては極めて重要な事であろう。

網地の色彩は自然光の強さ，光質，操業水深，透明度等によつて変る。従つて或る漁業に用いる網地の色彩の撰択に当つてはこれらの事象を加味した上で色彩の撰定をする必要がある。

一般に魚は色彩の辨別能力[1)2)3)4)5)]があるとされてはいるが，漁網等に対する場合でも色彩の辨別を行うことを基礎的な実験により確かめ，更に現場の漁網の色彩についてそれが漁獲の結果にどの様な影響を与えているかを解析しなければならない。この様な過程に於ける一段階の基礎的研究として種々な色彩の網地の網目を魚群が通過する場合網地の色彩がその魚群の行動にどの様に影響するかと云う実験的研究を行つた。

尚本実験は昭和 29 年度文部省試験研究費により行われた。

§ 2. 実験装置並びに方法

実験は本学小湊実験場及び本学においては昭和29年 9 月～12 月に行われた。実験魚にはアジ, *Trachurus trachurus* (LINNÉ) ムギイワシ, *Atherion elymus* (J. & S.) 及びコイ, *Cyprinus carpio* (LINNÉ) を用い，実験水槽は円型で，この中に円型の針金枠に着色網地をとりつけ水槽中央に設置した。此の着色網地を取付けた円型針金枠の中心に透明円筒を置き，実験開始前に実験魚をこの中に投入し，10 分間順応せしめた後この円筒を引き揚げる。円筒より発進した魚群は網目を通過して網枠の外側に出，或いは再び内側に入つてくるが発進時から 10 分間に亘つて魚群がどの色の網地を出入するかその度数を観測した。尚内側に残つている魚群の状態によつては一度外側に出た魚群が再び内側に戻ることもあるが，全魚群が外側に出た場合は内側に戻る事は観測中は殆んどなかつた。又実験開始後魚群の先頭魚が網目を通過する迄の時間を測定した。[6]

1957 年 11 月 13 日 受理

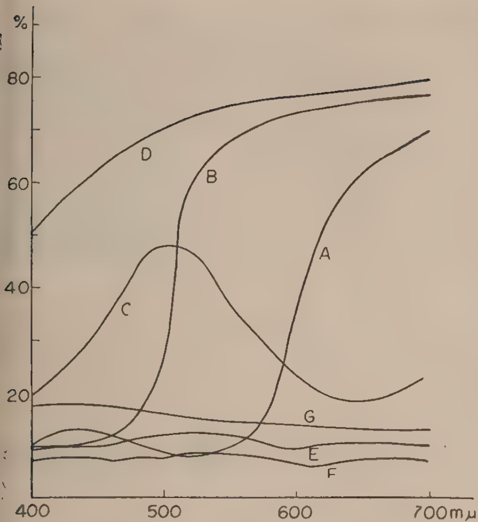


Fig. 1. Reflected light intensities for coloured nets used; ordinate shows reflected percentage of light, abscissa wave length in mμ. A, Red ; B, Yelloow; C, Green; D, White; E, Gray; F, Black ; G, Intensity curve for the light reflected from the inner side of the experimental tank.

実験室内は暗くし，水面上方各々2mの位置に水槽の中心に対し対称になるようにマツダ30ワット電球4個を点灯した場合及び2燭光の電球をつけ換えた場合につき実験を行つた。又電圧低下による照度変化を防ぐためスライダックにより電圧を常に 100v なるように調整して実験を行つた。実験装置の詳細をTable. 1に，着色網糸の反射率曲線を**Fig. 7**に示す。

アジ，ムギイワシについては夫々約1,200尾につき，漁獲後2日位蓄養してから使用し，実験魚は実験の度に変え又実験を通じて同一実験魚を3回以上使用しないよう心掛けた。コイについては200尾につき1週間位蓄養してから使用した。尚同一個体は実験に連続使用しないようにし実験を通じて1日に2回以上使用しないようにした。

実験開始にあたり針金枠に取付けた網の魚群に対する阻止効果を調べるため網の位置に針金枠のみを吊り下げ，円筒引揚げと同時にクロノグラフをスタートさせて観測を開始し，魚群の先頭魚が針金枠を通過するまでの時間を測定した。又観測者の位置のために魚群の行動に偏在的影響を与えるのを防ぐ為水槽に対する着色網地の位置を実験の度に変えて行つた。

§ 3. 実験結果

実験に使用した網糸はクレモナ 20 番手4本でこれを赤，黄，青緑及び黒，灰，白（素色）に染色し，縮結3割にして色彩及び明暗(濃淡)の各系列別の上記3種づつの網を各々の面積が等しくなる様に取付けた。尚網地の染色は顔料を合成糊で固定した。夫々の実験結果を Table 2 に示す。

1. アジ

色彩の相異と魚群の網目の通過については 30 ワット光源の場合，通過尾数の総計は赤 37 尾，黒53尾，青緑 64 尾で網糸反射光の主波長側の網目に魚群の通過の多い事を示している。又 20 回の対照実験で先頭魚の網枠を通過するに要する時間の平均は 16 秒であるに対し， 着色網の場合は 3 分 26 秒であるから魚群の行動に対する網地の阻止効果を認める事が出来る。又照度の低下によつて魚群の網地に対する通過尾数も多少変る傾向がみられる。次に網地の明暗については， 30 ワットの場合暗いものに通過は多いが， 2燭光の場合には 30 ワットの場合と逆の傾向を示した。尚1尾づつ行つた実験結果では黄及び白が通過率多く，青緑及び黒が通過率少なく，10 尾の場合と異つた傾向を示したが，これは水槽内の環境の魚群に与える影響が個体と群体では異るためと考えられる。

2. ムギイワシ

この実験では対照実験を行つていないが，アジの場合と同様に網の直前で魚群は一旦停止して網目を通過する行動が観察されるので漁網の阻止効果は認められる。実験の結果によると， 30 ワット光源の場合通過率は青緑，黄，赤の順で明度については明るいものに通過の多い傾向がみられるがあまり明瞭でない。

3. コイ

対照実験と比較して 30 ワット及び2燭光で夫々網地の阻止効果が認められる。色彩実験で 30 ワットの場合通過傾向は青緑>黄>赤の順になるが， 2燭光では通過が逆になる傾向が見られる。又明暗実験については 30 ワットの場合中間の灰色が通過が少ない傾向にあるが， 2燭光の場合その差が少なくなる傾向が認められる。

Table 7. The details of the experiments

Fish Spieces	Kind of experiment	Number of fish individual used for the experiment	Diameter of experimental tank and its depth (lower colum)	Dominant waves of coloured net (Brightness): Green and black (in parenthesis)	Yellow and gray (in parenthesis)	Red and white (inparenthesis)	Size of mesh	Body length of the fish	Illumination value directly above the water level; (Bottom)	The diameter of the frame and the transparent celuloid tube.	Water temp.
Trachurus trachurus (LINNÉ)	Colour experiment	10	2.5m (0.5m)	497.5mμ	575.7mμ	627.0mμ	18cm	15.4cm 9.8cm	31～3 lux (18 lux)	0.8m (0.5m)	19.8～ 24.7°c.
	〃	1	〃 (〃)	〃	〃	〃	〃	〃	31 lux (18 lux)	1.5m (〃)	〃
	Brightness experiment	10	2.0m (〃)	(4.0663%)	(6.454%)	(71.6962%)	〃	〃	31～3 lux (18 lux)	0.8m (〃)	〃
	〃	1	〃 (〃)	〃	〃	〃	〃	〃	31 lux (18 lux)	1.5m (〃)	〃
Atherion elymus (J. & S.)	Colour experiment	10	10m (〃)	497.5mμ	575.7mμ	627.0mμ	〃	5.9cm 4.9cm	31 lux (18 lux)	0.8m (〃)	〃
	Coloured experiment	10	〃 (〃)	(4.0663%)	(6.4549%)	(71.6962%)	〃	〃	〃	〃 (〃)	〃
Cyprinus carpio, (LINNÉ)	Colour experiment	10	〃	497.5mμ	575.7mμ	627.0mμ	6cm	5.5cm 7.6cm	43～5 lux (36～4 lux)	0.4m (0.15m)	9.8～ 13.8°C.
	Brightness experiment	10	(〃)	(4.0663%)	(6.454%)	(71.6962%)	〃	〃	〃	〃	〃

Table 2. The Results of the experiments.

Fish spieces	Kind of experiment	Light source	Fxperiment was repeated by	Frequency of fish passing through the net: Numder of fish indvidual used for the experiment	Red or white (in bracket)	Yellow or gray (in bracket)	Green or black (in bracket)	Total	Average interval from leaving the tube and passing through the net of a leader fish.
Trachurus trachurus (LINNÉ)	Preliminary	30 watt	20 times	10	—	—	—	262	16 sec.
	Colour	〃	〃	〃	37	53	64	154	3m. 26sec.
	Colour	2 candle	〃	〃	47	57	64	168	2m. 26sec.
	Brighthess	30 watt	〃	〃	(19)	(40)	(120)	(179)	1m. 54sec.
	Brighthess	2 candle	〃	〃	(111)	(70)	(47)	(228)	1m. 44sec.
	Colour	30 watt	〃	1	6	10	4	20	35 sec.
	Brightness	〃	〃	1	(8)	(3)	(2)	(13)	1m. 45sec.
Atherion elymus (J. & S.)	Colour	〃	〃	10	144	419	504	1,064	—
	Brighthess	〃	〃	〃	(163)	(70)	(114)	(347)	—
Cyprinus carpio, (LINNÉ)	Preriminaly	〃	〃	〃	—	—	—	514	1m. 9sec.
	Preriminaly	2 candle	〃	〃	—	—	—	376	58 sec.
	Colour	30 watt	〃	〃	44	78	102	224	1m. 10sec.
	Colour	2 candle	〃	〃	96	81	68	245	1m. 41sec.
	Brightness	30 watt	〃	〃	(142)	(91)	(114)	(347)	1m. 27sec.
	Brightness	2 candle	〃	〃	(76)	(84)	(86)	(246)	2m. 44sec.

§ 4. 考　　察

各実験とも実験回数も少なく，且つ魚群の着色網に対する行動判定の方法にも吟味の余地が多々あると考えられ，又魚群の行動の中に偶発的なものも含まれていないとは断言出来ない。然し乍らこれらの実験を通じて最も明瞭な現象は 30 ワットの光源を使用した場合，青緑，黄，赤の中最も阻止効果の大きなものは赤で，実験の範囲ではアジ，ムギイワシ，コイ何れについても共通に認められた。又照度の低下した場合アジ，コイについて何れも夫々の色彩間での通過尾数の差は少なくなる傾向が認められる。これは恐らく明るさの変化によつて（実際は光質も異るが），魚群の網地に対する感覚反応の状態が変る為であろう。Fig. 2 に通過尾数と着色網糸の反射光の主波長との関係を示す。これらによると 30 ワットの光源の場合には主波長の短かい青緑網に通過の傾向が良好である。明暗の相異した場合通過傾向は魚種により一定していない。

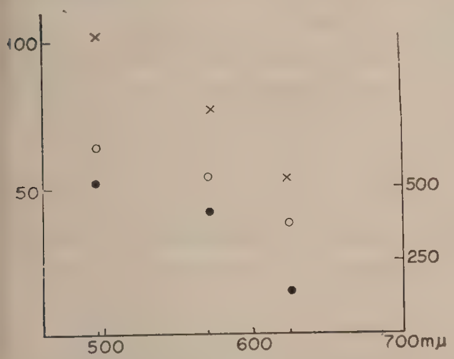


Fig. 2. The relation between the number of fish passing through each coloured net and dominant wave length of the light reflected from each net. ○, ●, × represent *Trachurus trachurus* (LINNÉ), *Atherion elymus* (J. & S.) and *cyprinus carpio* [LINNÉ], respectively. Left axis shows the *Trachurus trachurus* [LINNÉ] and *Cyprinus carpio* [LINNÉ], right axis the *Atherion elymus* [J. & S.].

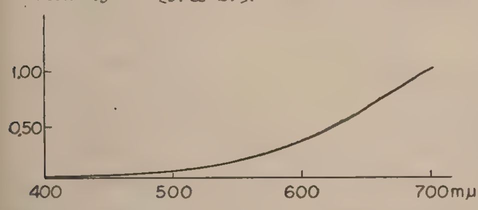


Fig. 3. The intensity spectrum of illumination due to 30 watt light sources measured on the water surface. Numerals on the ordinate show relative dominance of a definite wave length and the adscissa the wave length of illuminating light.

そこで 30 ワットの場合実験状態においてスペクトル分布を科研製フィルターにより測光し計算*すると Fig. 3 の如くなり，このスペクトル分布と着色網糸の反射率曲線により青緑色網糸の反射光に対する黄色及び赤色網糸の反射光の強さの比を計算**して，之と魚群の各着色網地に対する網目通過尾数との関係を図示すると Fig. 4 の如くなり，魚群の網目通過尾数は網糸の反射光の強さと，直線的な関係がないことが分る。これらの結果によると着色網に対する魚群の網目通過は波長による影響が大きいと予想される。然しこの場合反射光の強さが同じでも波長の異る場合もあるので今後の実験にまちたい。

ここでは異つた着色網 3 枚をつなげて実験したために夫々の色彩間の対比現象が魚群の行動に影響を

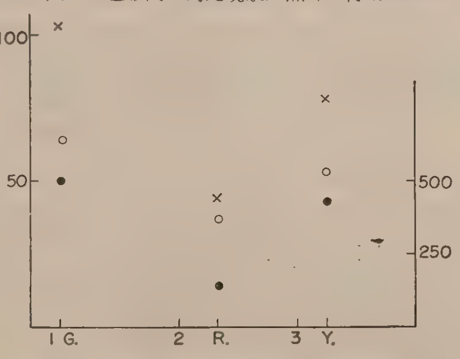


Fig. 4. The relation between the number of fish passing through each coloured net and the relative intensity of reflected light, which was evaluated using green net as standard. Numerals on the ordinate are the same as in Fig. 2.

* スペクトル分布の計算，セレン光電池の指針の読み I，光電池の感度曲線 S_λ，科研製フィルターの透過率曲 T_λ，光源の輻射強度曲 F_λ とすると， $I=\int_{\lambda_1}^{\lambda_2}F_\lambda\ T_\lambda\ S_\lambda\ d_\lambda$ 上式より $\int_{\lambda_2}^{\lambda_1}F_\lambda\ d_\lambda=\frac{I}{\int_{\lambda_2}^{\lambda_1}T_\lambda S_\lambda d_\lambda}$ これを各フィルター別（5枚）に近似的に計算して求め，フィルターの透過曲線の透過率最大の波長上に計算値をプロット，これらの各点をつらねてスペクトル分布を求めた，尚波長は可規範囲として 700～400mμ とした。

** 反射光の強さ R_λ は夫々の色彩別に $R_\lambda=\int_{\lambda_2}^{\lambda_1}F_\lambda\ T_\lambda\ d_\lambda$ を近似的に求め，青緑網に対する比を求めてプロットした。

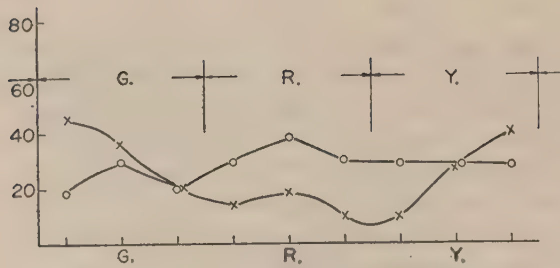


Fig. 5. Showing the number of fish (*Cyprinus carpio* (LINNÉ)) passing through the three equally divided portions of each coloured net. ○ is the in the case of 2 candle of illumination and x is the value for 30 watt.

与えている事が考えられる。1例としてコイについて30ワット及び2燭光の光源の場合，青緑，赤，黄を夫々3等分してその各部分の網地を通過した尾数を測定すると Fig. 5 の如く赤を中心にしてそれにつづく両側の網地の部分では通過の悪い傾向がみられ，恐らくこれは夫々の色彩間の対比現象のためと考えられる。2燭光になると各部分での通過尾数の差は少ない。

魚群の昼夜間の行動の差異については夫々の魚種でかなり異る事が報告されている。本実験ではアジ，ムギイワシは全て夜間に実験を行ない。コイは昼間行つた。水温，周囲とのコントラストも問題になるであろうが，ここでは水槽内面には灰色を用いた。

§4. 要　　　約

1. アジ，ムギイワシ，コイについて青緑，黄，赤及び黒，灰，白に染色した網地の魚群に対する阻止効果を調べた結果，30ワットの光源を使用した場合，網地の阻止効果は赤>黄>青緑の順に大きく，黒灰白については魚種により異なる結果を与えるようである。

2. 色彩影響の実験について 30 ワット光源を使用した場合に各網糸から反射される光の強さを調べたところ，アジ，ムギイワシ，コイいずれの場合も魚群に対する阻止効果は網糸反射光の強さには比例せず。反射光の波長に比例するように思われた。

3. 光源の差異により着色網に対する魚群の行動も異ることをアジ及びコイについて確かめた。

4. 異つた着色網をつなぎ合せて実験したため，結果には対比的現象の関与が認められた。

実験に当り材料その他種々御高配を賜わつた東海区水産研究所漁具漁法部及び本学小湊実験所宇野講師、又実験に当り種々手伝つて頂いた本学学生，九鬼望，木田茂孝両君に深甚の謝意を表する。

文　　　献

1) 本城市次郎 : 動物の感覚，東京，(1952).
2) H. Graundfest : J. Gen. Physiol., 15 307～327 (1931).
3) 川本信之他 : 水産研究会報，3～5，(1950～1953).
4) 大倉史郎他 : 水産研究会資料，101 号 (1955).
5) 草下孝也 : 日水会誌， 22， (11) (1957).
6) 相良守次 : 行動の理解，東京，(1943).

漁網の色に関する研究—II.
着色網地に対する魚群の行動及び魚群の網目通過について

神田献二　小池篤　小倉通男
(東京水産大学)

The Study on the Colour of Fishing Net—II.
Behaviours of Fish Schools in the Neighbourhood of a Coloured Net.

Kenji KANDA, Atushi KOIKE, and Mitio OGURA

Two pieces of different coloured nets were combined with one another side by side and set stretched in an outdoor pool (length, 26m; width 5m; depth 1.5～0.7m). The behaviours a school of rainbow-trout, *Salmo gairdnerii irideus* (GIBBONS) takes in the neighbourhood of the net were observed, the results obtained being summarized as follows:

1. In so far as a large difference in the number of fish passing through is detectable between the individual pieces of net, the fish school behaves quite specifically according to the sort of colour of the net.

2. The colours of net examined were red, orange, yellow, green, and blue; and effectiveness of these colours in the fish passage increased in the order : green >blue> yellow=orange >red. Thus, relative passability for fish estimated for individual nets on the basis of green net varied with the dominant wave length of the reflected light.

3. No marked difference is detectable between the curves drawn for the distribution of light spectrum in the pool water on the one hand and for the relative intensity of the light reflected respectively from blue and green nets on the other resembles one another closely. This suggests that the weak barring effect of a blue or green net against fish passage may well be attributed to the weakness of contrast made by these nets to their surroundings.

§ 1. 緒　言

前報[1]においてはアジ，ムギイワシ，及びコイについて水槽実験を行つた結果を報告したが，ここではニジマスを用いて野外実験を行つた結果について報告する。

水槽実験においては実験条件を一定にし，特定の条件のみに対する魚群の反応を調べるには都合がよいが，魚群の遊泳水域が限定されるため，魚群の行動の全てが自然の状態であるかは分らない。従つてここでは野外の池を使用し，これ等の点に留意しつつ実験を行つた。これらの実験では魚群の大きさがフィールドにおける魚群の大きさとほぼ等しいことが理想的には望ましい訳であるが，ここでは魚体の大きさに比べ出来るだけ大きな池において実験を試み，且つ使用個体数を出来るだけ多くし，従来の実験で行つた個体についての観測と併せて群行動の観測を行なう様にした。尚本実験は昭和30年文部省試験研究費の交付を受けた。記して謝意を表する。

§ 2. 実験方法

実験は本学大泉実習場において昭和30年9月中旬に行つた。実験魚はニジマス *Salmo gairdnerii irideus* (GIBBONS)で体長 90～120mmのもの約10,000尾が蓄養された長さ26m. 巾5m. 深さ0.7m(注水口)～1.5m(排水口) の池を用いた。実験池の魚群は水槽の中央から排水口側に7, 注水口側に3の割合で分離しており，この分離した魚群が遊泳中合同する事は極めて稀であり，又実験池の長辺に沿つて太陽の移行により影が生じるが，この影が魚群の偏在を生じる一つの原因となる。そこで本実験では影の少ない午前9時から15時の間

1957年11月13日受理

に行つた。又魚群の行動は午前中は比較的緩漫であるが，午後になると活潑になることが観察された。実験に当つては実験池の短辺に張りつめられる様に仕上り長さ 2.5m, 深さ 1m の色彩の異つた網 2 枚をつなぎ，排水口より 8m の地点に設置した。実験池の概要を Fig. 1 に示す。

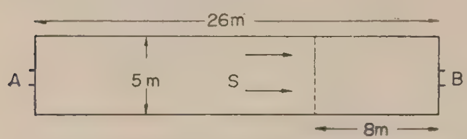


Fig. 1. Outline of the pool used in this experiment. A, entrance of water ; B, scupper hole; S, fish school.

使用した網糸は第1報[1]と同じクレモナ 20番手 4 本 (直径0.5mm)で目合 3 寸, 縮結 3 割とし，色彩の種類は青，青緑，黄，橙，赤の 5 種類について全ての色彩の組合せについて各 4 回宛実験を行つた。使用した網糸の色彩は第 1 報[1]と同じもので(青緑, 黄, 赤)，夫々の反射率曲線を Fig. 2 に示す。実験時間は各実験の中 2 回は午前中に，2 回は午後に行なうようにし，且つ実験毎に網地の向きを変えて行つた。又実験の前に給餌により魚群を実験池中央に誘い出し，排水口にいる魚群を出来る丈少なくし，網地の面で排水口側及び実験池中央側の魚群が網地の附近で成群行動をとる事を防いだ。かくして池の中央側より排水口に向かう魚群が網地に近接した際起す魚群行動の変化及び網目を通過する魚群の尾数を 15 分間に汎つて測定した。実験池の水温は湧水の為常に 10.5°〜10.6°Cである。

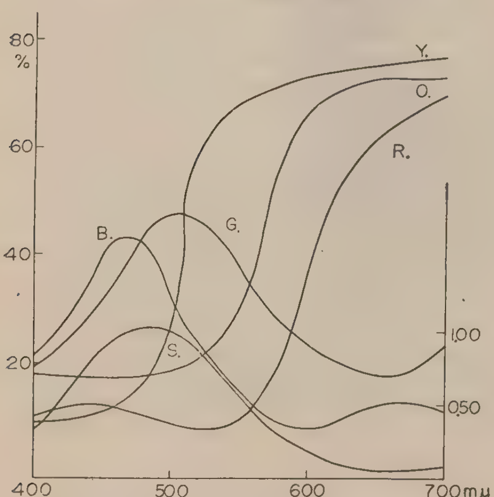


Fig. 2. Relative intensity curves for the light reflected respectively from different coloured nets shown together with the light spectrum distribution in the pool water. S, spectrum distribution of light in the pool ; ordinate of right hand shows the spectrum relative intensity of light and left hand shows the reflected relative intensity of netting cord in percentage, abscissa shows wave length.

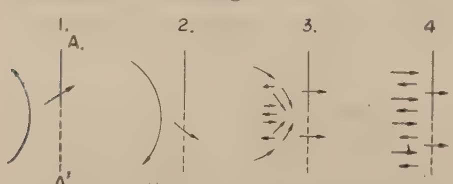


Fig. 3. Specific types of behaviours assumed by fish schools in the vicinity of a coloured net. A, A′ are green coloured nets.

§ 3　実験結果

1.　各種着色網と魚群の行動

網地に近接する魚群の形状には種々あるが，色彩の同じ網 2 枚をつないで行つた実験結果 (何れの組合せも 2 回づつ行つた) では Fig. 3 に示す 4 種が

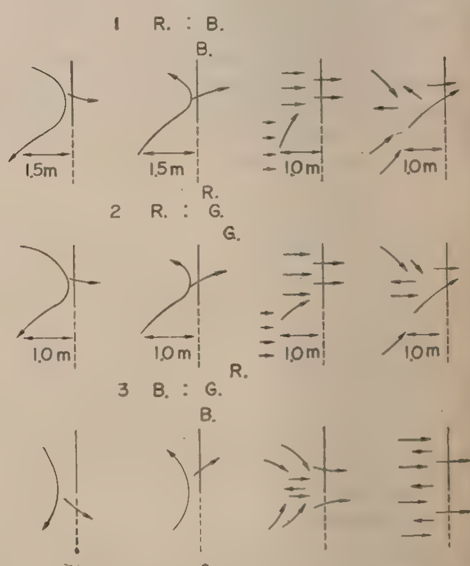


Fig. 4. Effect of different coloured nets on the typical behaviours of fish schools near the nets. 1-2, the behabiour of fish schools is specific for each net. 3, fish schools behave alike for each net.

代表的な型である。又魚群の中で先頭に立つ魚群は網地の前面で一旦停止後反転する事が多いが，観測結果では群の後部のものが網目を通過する事が多いようである。Fig. 4 に魚群の着色網に対する行動の 1 例を示す。行動を定量的に示す事は難かしいが，着色網に対する撰択性を調べてみると Fig. 4 の青：青緑では接近魚群の頻度は Fig. 3 で示した 1 型については20例, 2 型は 18 例, 3 型はなし, 4 型は 2 例であるが何れの接近型においてもほぼ Fig. 4 に示す如く視認によつて行動差を認める事は不能であつた。又赤：青については 1 型は26例, 2 型は28例, 3 型は18例, 4 型はなしその他以上の型が複合された場合が 6 例，又赤：青緑については 1 型は24例, 2 型は26例, 3 型は 1 例, 4 型は 3 例, その他複合型が 4 例で，何れの場合もほぼ Fig. 4 に示す如く視認によつて明瞭に行動差を認める事が出来た。かくしてその他の赤：橙，赤：黄，橙：青緑，黄：青緑についても明瞭に行動差を認め得たが，橙：黄，橙：青，青：黄では差が認められなかつた。

2. 各種着色網に対する魚群の網目通過について

魚群の網地に近接する際の魚群の回転方向が網目通過に及ぼす影響の大きいことが観測された。即ち Fig. 3 で 1 型の魚群では A 網から，2 型の魚群では A′ 網より通過する傾向が多いので魚群の回転方向の網目通過に及ぼす影響も考慮に入れて上述の如く網地の向きを交互に変えて実験を行つた。実験に使用した夫々の着色網に対する通過尾数を Table 1 に，青緑網の通過を 1 とした場合の各網の通過比率を Table 1 及び Fig. 5 に示す。

これらの結果によると阻止効果の大きいものから赤，橙＝黄，青，青緑の順になる。又通過比率に大きな差異のある場合には魚群の行動にも差異の多い事が認められた。

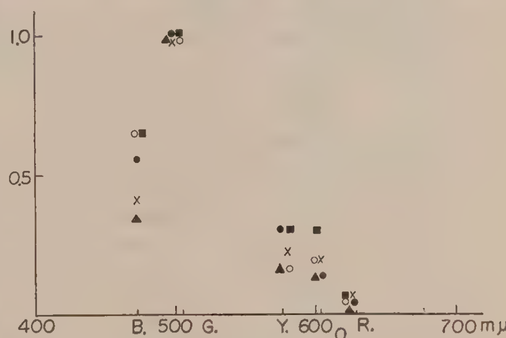


Fig. 5. Relative passabilities of fish for different coloured nets estimated with green net as standard, ●, red nets connected to others, △, yellow nets connected to others; ×, orange nets connected to others; O, green nets connected to others; ■, blue nets connected to others.

§ 3 考察

第 I 報[1)]で報告した水槽実験の結果と本年度野外で行つた実験で有色彩の場合には実験結果は同じ傾向を示す。昨年度は実験個体の数も少なく，且つ水槽も定まつた大きさで自然のままの魚群の行動を観察するには十分であるとは云えなかつたが，本年度の観測結果によると魚群の行動が色彩の相違により大きく影響されることがわかり；且つ網目通過尾数も明瞭な相違を示すようである。

Fig. 5 によると最も通過の良好な青緑を中心とし，これより夫々の着色網の主波長がづれるに従つて通過が減少する傾向がみられる。即ち日中十分明るく，且つ透明な水域ではニジマスの着色網に対する行動は着色網の反射光の波長によりかなり異ることが分る。又色彩の異つた網 2 枚をつないで実験を行つたので，対比現象も予想されるが接合する網の種類によつて通過比率が逆になることは少ない。

今実験池底の上向きの水中スペクトル分布を科研製水中照度計にフィルターを使用して近似的に計算*してみると，Fig. 2 に示す如く，青，青緑の反射率曲線にかなり似た傾向を示している。即ち青，青緑網と周囲とのコントラストが最も少ないと考えられる。これが着色網に対する行動を規定する原因の一つであり，又この様なスペクトル分布の環境に棲息する魚群は青，青緑色に馴れているためとも考えられる。

§ 4. 要約

1). 着色網に対するニジマス魚群の行動及び網目通過尾数を調べた結果，組合せた二枚の夫々の着色網に対する通過比率の差の大きな場合には，魚群の行動の上からも着色網に対する行動差が認められた。

2). 使用した着色網，赤，橙，黄，青緑，青の範囲では赤>橙＝黄>青>青緑の順に阻止効果が大きいと考えられる。青緑網を基準にして求めた夫々の着色網に対する通過比率は，夫々の色彩の主波長により相違する。

3). 実験池中のスペクトル分布曲線と青及び青緑網との

* フィルターの透過率曲線は製作技術の困難さのため必ずしも相似型でないが第 I 報と同様にして計算した。

反射率曲線は良く似ている。青，青緑網の阻止効果少のないのは周囲とのコントラストが少ないためと考えられる。

実験に際し御指示を賜わつた田内博士，又種々御配慮頂いた大泉実習場植松善次郎氏，高感度照度計を貸与された佐々木忠義博士，照度測定に際し種々忠言を頂いた科学研究所岡見登氏及び大柴五八郎氏，実験を手伝つて頂いた本学学生九鬼望，木田茂孝，遠藤克己，高田宏，筏津栄一の諸君に心より謝意をのべる。

	R	O	Y	G.	B.
R		1 100 (0.142) —	3.300 (0.302) —	3.400 (1.000) —	6.900 (0.556) —
O.	320 (0.056) +		4.000 (0.243) —	8.300 (1.000) —	6.600 (0.411) —
Y	450 (0.023) +	3.300 (0.134) —		3.200 (1.000) —	8.700 (0.355) —
G.	140 (0.041) +	1.600 (0.193) +	520 (0.163) +		4.600 (0.657) —
B.	510 (0.049) +	3.100 (0.309) —	4.000 (0.302) —	7.000 (1.000) —	

Table 1. Frequency of a typical behaviour assumed by fish schools near the net of a definite colour. Nunmber of fishes passing through a coloured net (upper line), values of relative fish passage for differently coloured nets (middle line, evaluated using green coloured net as standard), and departure from the normal type behaviour of fish schools (lower line; +, specific; −, not specific) evaluated by using two different coloured nets mutually connected side by sioe.

文　　　　献

1) 神田献二. 小池　篤：本誌 23, (10), (1958)

漁網の色に関する研究—III.
網地の色彩の濃淡が魚群の行動に及ぼす影響について

神田献二・小池篤・小倉通男
(東京水産大学)

The Study on the Colour of Fishing Net—III.
Effect of the Depth of Colour of a Net on the Behaviour of a Fish School Near the Net.

Kenji KANDA, Atushi KOIKE, and Mitio OGURA

1) As for the behaviour of a fish school (*Salmo gairdnerii irideus* (GIBBONS)) approaching the nets with a colour of the same stamp but of different depth, no difference was detected between the kinds of colour examined, i.e., blue or green, red, and brown. The manner in which the depth of colour of a net affects the behaviour of a fish school was by no means of the same trend independent of the kind of colour of the net.

2) Like the previous experiment, also the present experiment manifests that, while it is quite light in the day time, the behaviour of fish school near a coloured net is influenced more strongly by wave length than by intensity of the light reflected by net cords.

3) From the observations on the behaviour of fishes schooling near a net of no particular colouration, it was found that a black net was least effective in fish stopping action.

1. 緒言

第I報[1]で着色網地の網糸反射光の強さを計算し，これと魚群の網目通過との関係をしらべたが，この場合使用した網糸の反射率曲線の分布が異るので，単に反射光の強さだけを取出して扱うことは出来なかつた。又第II報[2]では網糸の反射光の波長により魚群の行動が異ることを報告した。ここでは着色網糸の反射率曲線の分布がほぼ等しく（色彩が同じ），明暗（濃淡）のみが異る着色網地に対する魚群の行動を観察し，着色網の反射光の強さと魚群の網目通過との関係を調べたのでその結果について報告する。

尚本実験は昭和30年度文部省試験研究費の交付を受けた。ここに記して謝意を表する。

2. 実験方法

実験場所は本学大泉実習場において昭和30年12月中旬～下旬にかけて行つた。実験魚はニジマス，*Salmo gairdnerii irideus*(GIBBONS)で，体長 90～120mm のもの約10,000尾が蓄養された長さ26m，巾5m，深さ0.7～1.5m の池を用いた。実験に使用した網地の大きさ，糸の太さ，目の大きさ等は全て第II[2]報のものと同じであり，色彩の種類は有彩色としてカツケ色，青緑色，赤色の三種，無彩色として黒，灰，白の三種を用いた。尚夫々の有彩色を濃，中間，淡の三種に染め分け，夫々の色彩系列別に二枚づつの異つた濃淡の網を組合せて実験を行つたが，実験方法等は全て第II[2]報の場合と同様である。使用した着色網糸の反射率曲線を Fig. 1 (I)，(II) に示す。

3. 実験結果

1) 各種着色網と魚群の行動

第II報[2]と同様にして魚群の行動を調べてみると，白：黒では第II[2]報で報告した魚群型の中，1型に属するもの35例，2型40例，3型5例，4型15例，その他複合型が5例でほぼ Fig. 2 Aに示す如く視認により行動差が認められ暗い網に魚群はより近接する傾向が認められた。淡青緑：濃青緑については1型40例，2型52

1957年11月13日受理

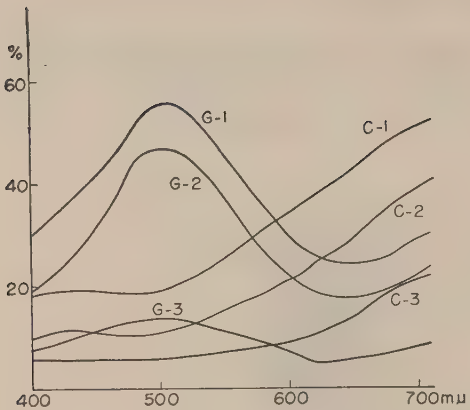


Fig. 1 (I). Curves showing the percentage reflection for coloured nets, abscissa shows the wave length. Green net, G-1, most light; G-2, middle; G-3, most dark: Cutch coloured net (brown), C-1, most light, C-2, midle, C-3, most dark.

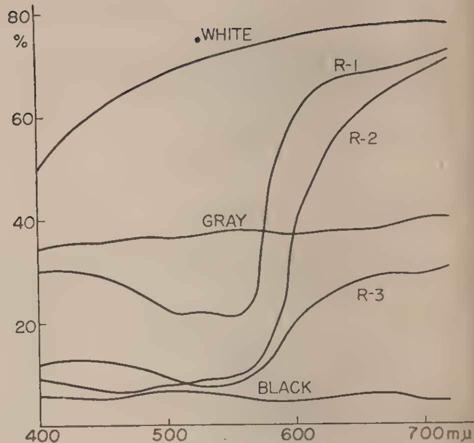


Fig. 1 (II). Curves showing the percentage reflection for coloured net, abscissa shows the wave length. Red net, R-1, most light; R-2, middle; R-3, most dark. Others non-coloured nets.

Table 1. The results of experiments. Upper figures : Number of the fish passing through each differently coloured net. Lower figures : Fish passabilities of various nets estimated by using the value for the most easily passable net as standard (shown in parenthesis).

A Green coloured net

	Light	Middle	Dark
Light		3,700 (1,000)	1,900 (0.832)
Middle	2,600 (0.702)		4,700 (0.702)
Dark	1,600 (0.591)	6,700 (1,000)	

B. Red coloured net

	Light	Middle	Dark
Light		1,300 (0.376)	676 (1,000)
Middle	1,400 (0.548)		543 (1,000)
Dark	275 (0.406)	276 (0.509)	

C. Cutch coloured net (brown)

	Light	Middle	Dark
Light		— —	88 (0.327)
Middle	— —		348 (–)
Dark	266 (1,000)	580 (–)	

D. Non-coloured net

	Light	Middle	Dark
Light		3,300 (0.861)	866 (1,000)
Middle	2,400 (0.317)		1,500 (1,000)
Dark	542 (0.625)	653 (0.435)	

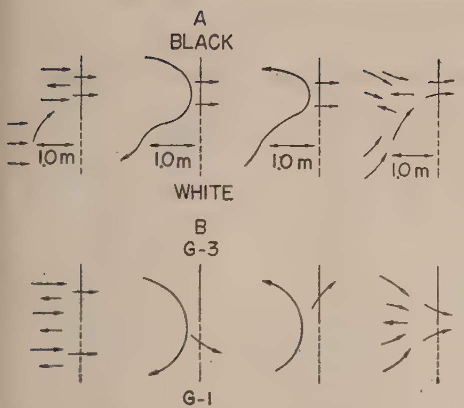


Fig. 2. Effect of differently coloured nets on the typical behaviours of fish schools near the nets. A, Black net＋white net ; B, G-1 net ＋ G-3 net.

例，3型10例，4型5例，その他複合型が16例であるが何れの場合もほぼ Fig. 2 B に示す如く視認では魚群の行動差は認められなかつた。同様にして中青緑：濃青緑についても行動差は認められない。これらの実験より同一色彩で濃淡のみ相違したときには魚群の行動には差異のない事が分り，他の異つた色彩で濃淡のみ相違した場合についても同様の傾向を示すことが推定される。

2） 各種着色網に対する魚群の網目通過について

Table 1 に各網に対する通過尾数及び各色彩系列別に最も通過の良い網に対する通過尾数についての比率を示す。これらによると青緑系統では中間の青緑が通過の良好な傾向があり，赤系統では濃いものが良好，カツチ系統では淡い網が通過が良好である事がうかがわれる。無彩色の場合には暗い網が通過は良好である。

3. 考　　察

実験結果によると有彩色の場合各色彩の系列別に濃淡の相異に対する魚群の網目通過は統一ある結果を示さない。即ち赤系統では濃い網，青緑系統では中間の網，カッチ系統では淡い網が夫々通過傾向の良好な事が分る。併し魚群の行動上から同一色彩系統内では何等相違がみられなかつた。今夫々の色彩の反射光の強さを水中のスペクトル分布*，網系の反射率曲線より計算し，夫々の色彩系列別に最も濃い網に対する反射光の強さの比を計算し，又色彩系列別に最も通過の多い網に対する夫々の色彩網の通過比との関係をしらべてみると Fig. 3 の如く，夫々の色彩系の間で統一のある関係は認められない。これらの点と第Ⅱ[2)]報の結果を参照すると，ここで行つた実験の範囲では着色網地に対する魚群の行動は有彩色の場合，網糸の反射光の強さよりも網糸の反射光の波長によつて左右される事が多いと云える。今夫々の網地の反射光の強さを計算したが，これらの計算結果を確かめるため暗室内で標準電球により（スペクトル分布既知）各着色網地を照射し，夫々の網地よりの反射光を光電池照度計で測定した結果，及び同一光源下における各着色網の反射光の強さの計算結果について，夫々の色彩系統内での各網の反射光の強さの比を求めると Table 2 に示す如く，実測値と計算値で値の異るのは照度計の感度の不良のためとも考えられるが，これらの計算値で反射光の強さの目安をつける事が出来ると考えられる。無彩色の場合には濃い網が阻止効果の少ない点からみて，この場合有彩色の濃淡と無彩色の濃淡では魚群の行動に与える影響は異るものと考えられる。

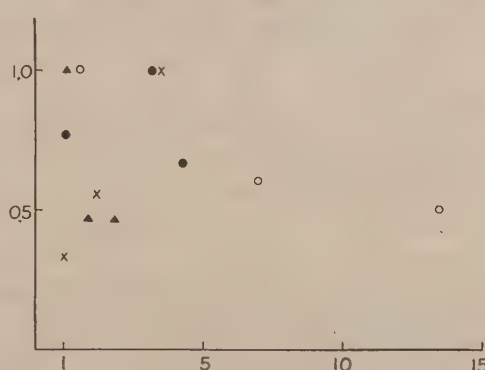


Fig. 3. Ratios between fractional reflections for the nets respectively evaluated with darkest coloures of different kinds (abscissa) shown together with ratios between maximum values for fish passability of the nets respectively (ordinate) having different kinds of colour. ●, Green coloured net; ▲, Red coloured net ; ×, Cutch coloured net; ○, Non-coloured net.

* 第Ⅱ報参照

Table 2. Observed and calculated intensities for the lights reflected by differently coloured nets.

Net	Observed value (Lux)	Observed relative intensity of reflected light	Caluculated value	Calculated relative intensity of reflected light
White	13.0	1.000	14288.18	1.000
Black	1.0	0.077	953.72	0.067
Light red	10.7	1.000	8859.51	1.000
Middle 〃	7.7	0.712	5425.93	0.612
Dark 〃	5.1	0.476	3082.02	0.349
Light green	9.8	1.000	6888.67	1.000
Middle 〃	5.3	0.541	5483.66	0.796
Dark 〃	1.9	0.194	1525.84	0.221
Light cutch coloured net	5.0	1.000	6171.95	1.000
Middle 〃	2.8	0.560	3757.18	0.609
Dark 〃	2.4	0.480	1666.17	0.270

4. 要　　約

1) 有彩色の場合同一の色彩で濃淡のみが異つた着色網に対するニジマス魚群の行動は，青緑系，赤系，カッチ系内の夫々でその差異が認められず，又上記の色彩系を通じて魚群の網目通過の傾向は統一ある結果を示さない。

2) 第Ⅱ[2)]報及び本実験を通じて昼間充分明るい間は着色網に対するニジマス魚群の行動は，実験の範囲では，網糸の反射光の強さよりも波長により影響される。

3) 無彩色の場合，黒色網地の魚群に対する阻止効果が最も少ないことが，魚群の行動及び網目通過の状況より判断された。

本実験を行なうに種々御便宜頂いた本学大泉実習場植松善次郎氏，網地の染色に際し協力を頂いた大日精化工業株式会社小沢準氏，実験に際し手伝つて頂いた本学学生木田茂孝，九鬼望，遠藤克己，筏津栄一，高田宏の諸君に謝意を捧げる。

文　　献

1) 神田献二・小池　篤：本誌，23，(10) (1.958)

2) 神田献二・小池　篤・小倉通男：本誌，23，(10) (1.958)

Glycylglycine Dipeptidase に対する金属イオンの影響—VII*
Glycylglycine 誘導体と Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++}, の関係に就いて

斗ケ沢宜久・勝又悌三
(岩手大学農学部)

Effects of Metal Ions on the Glycylglycine Dipeptidase—VII. On the Interaction between Glycylglycine Derivatives and Co^{++}, Mn^{++} and Mg^{++}

Yoshihisa TOGASAWA and Teizo KATSUMATA

Glycylglycine (GG) dipeptidase samples were prepared from pyloric caeca of fish (tunny, bonito, and yellowtail). With these preparations, the activation effects of metal ions such as Co^{++}, Mn^{++} and Mg^{++} were investigated using a few GG derivatives as substrates, e. g., sarcosylglycine, N-dimethylglycylglycine, glycylsarcosine, and glycyglycinamide.

The results obtained by spectropho to metric observations as well as chemical analyses seem to suggest that :

1). Co^{++} forms coordination compound like enzyme–Co^{++}–substrate', similarly to the SMITH's case.

2). Mn^{++} acts the same as Co^{++} does (Figs. 1—6).

3). Mg^{++} coordinates to a slight extent only with GG, but never with deriratives of GG (Figs. 1—6).

麦芽，小腸粘膜，心臓，子宮，血清，麹菌などから抽出した glycylglycine dipeptidase が Co^{++} 及び Mn^{++} により賦活される事実は諸氏[1-9]により報告されており，その賦活機構は SMITH[5,6,9,10]により Substrate–Co^{++}–enzyme 配位化合物の形成によるものと推論されている。

著者等はマグロ，カツオ，ブリ幽門垂中の glycylglycine dipeptidase が Co^{++}, Mn^{++} により賦活される以外に Mg^{++} によつても賦活される事実を認めた[11,12]。従つて之等金属イオン特に Mg^{++} による賦活機構を追求する一手段として SMITH [5,6,9,10] の方法に準拠し，基質反応基を明らかにすべく glycylglycine の反応基である NH_2, CONH, COOH を夫々閉塞した sarcosylglycine, N-dimethylglycylglycine, glycylsarcosine, glycylglycinamide を合成し Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} との配位化合物形成の有無を検討し，同時に酵素試験も併せて行い結果を検討した。

実験の部

1. glycylglycine 誘導体の合成

1) glycylglycine $NH_2CH_2CONHCH_2COOH$ の合成：従来の方法[11,12]により合成した。m.p. ; 215～218°C, 全窒素 21.27% (理論値 21.21%)

2) sarcosylglycine $\frac{CH_3}{H}>NCH_2CONHCH_2COOH$ の合成：LEVENE 等[13]の方法により合成した。m.p.

1957 年 6 月 29 日受理
*昭和 32 年 4 月日本農芸化学大会で講演

196～197°C 全窒素 19.22％（理論値 19.17％）

3） N-dimethylglucylglycine $\frac{CH_3}{CH_3}>NCH_2CONHCH_2COOH$ の合成 ： Levene 等[13] の方法により合成したchloroacetylglycine（m.p. 99～100°C 全窒素 9.15％ 理論値 9.24％）5g を 25％ dimethylamine（東京化成工業株式会社製）20cc に溶かし Smith[6] の行つた方法により N-dimethylglycylglycine hydrochloride を合成した。m.p. ； 185～186°C 全窒素 14.20％（理論値 14.24％）

4） glycylsarcosine $NH_2CH_2CON(CH_3)CH_2COOH$ の合成 ： 種々の方法[13,14,15,16,17,18] を参考にし phthaloyl 法を応用した。即ち Billmann [19] の方法により合成した phthaloylglycine（m.p. ； 191～192°C 全窒素 6.83％ 理論値 6.82％）に志村記載の方法[20] により $SOCl_2$ を作用させて合成した phthaloylglycylchloride （m.p. 84～85°C 全窒素 6.30％ 理論値 6.26％）4.47g を 10 cc の温 benzene に溶かし， 之を sarcosine 1.78 g と CH_3COONa 2.72 g を 60 cc の氷醋酸に少しく温めて溶した液に加え，steam bath 上で1時間還流加熱する。不溶解性白沈が生ずるので濾別後，濾液を濃縮して syrup 状にし之を室温に放置し得た粗結晶を熱水から再結して phthaloylglycylsarcosine の白色柱状の結晶を得た。m.p. ； 149～150°C 全窒素 10.07％（理論値 10.14％）。phthaloylglycylsarcosine 1.38 g（0.005 M）に absolute ethanol 20 cc を加え 60°C で溶かし，之に 80％ hydrazine hydrate を 0.01 M に調製した 20 cc の absolute ethanol 溶液を加えると混液は無色から黄色に変化し少量の白沈を生ずるが water bath で加熱すると直ちに透明になり更に加熱を続けると再び白沈を生じて来る。1 時間還流加熱し濾過する事なく全体を減圧濃縮して alcohol を完全に除き，残渣を蒸溜水 30 cc に懸濁し稀醋酸で pH 5～6 にする。更に water bath 中で 30 分加熱後氷冷，析出せる phthaloyl hydrazide を濾別後，濾液を減圧濃縮して syrup 状にし，absolute ethanol を徐々に加えて攪拌する事により glycylsarcosine の結晶を得た。m.p. ； 220～221°C 全窒素 19.10％（理論値 19.17％）

5） glycylglycinamide acetate $NH_2CH_2CONHCH_2CONH_2 \cdot CH_3COOH$ の合成 ： 種々の方法[15,16,17,18,21,22] を参考にし phthaloylglycylchloride 2.236 g（0.01 M）を 20 cc の benzene に溶かし glycine ethylester（Hillmann 法[23] により合成）の 0.01 M benzene 溶液 20 cc と混合，一昼夜室温に放置後減圧濃縮し，残渣に 50％ ethanol 100 cc 加え，80°C に加熱溶解せしめその濾液から phthaloylglycylglycine ethylester の白色針状結晶を得た。m.p. ； 195～196°C 全窒素 9.70％（理論値 9.65％）。phthaloylglycylglycine ethylester 2.9 g を 0°C で乾燥アンモニアガスを飽和させた methanol 30 cc 中に溶解せしめ室温に 2 日間放置して得た粗結晶を methanol から再結し phthaloylglycylglycinamide の結晶を得た。m.p. ； 253～255°C 全窒素 16.23％（理論値 16.08％）。phthaloylglycylglycinamide 1.3 g（0.005 M）を ethanol 50 cc に懸濁，氷醋酸 0.3 cc 及び 80％ hydrazine hydrate 0.8 cc を加えて water bath 上で 1 時間還流加熱後減圧濃縮して ethanol を完全に除き，残渣を蒸溜水 30 cc に懸濁して稀醋酸で pH 5～6 に調節すると phthaloyl hydrazide が折出する，之を更に water bath 上で 10 分間沸騰後氷冷折出する phthaloyl hydrazide を濾別，濾液を減圧濃縮し glycylglycinamide acetate の結晶を得た。之を methanol 又は methanol ethylacetate から再結し m.p. 234～235°C の結晶を得た。全窒素 22.10％（理論値 21.98％）

2. glycylglycine 誘導体と Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} の配位化合物形成の有無

1） glycylglycine 誘導体と Co^{++} の関係

合成した glycylglycine（GG），sarcosylglycine（SG），N-dimethylglycylglycine（NDGG），glycylsarcosine（GS）の最終濃度 0.125 M，glycylglycinamide acetate（GG amide）0.1 M に調製した溶液を 5 cc のメスフラスコに各々 2 cc 取り，更に $CoCl_2$ の 0.01 M 溶液を 2 cc 加え，0.25 N-NaOH で pH を 7.8 に調製し蒸溜水で 5 cc に稀釈，之を 25°C の恒温器に 20 時間放置後 Beckman spectrophotometer で吸光度を測定し配位化合物形成の有無を検討したが Smith の報告[6,9] と殆んど同一結果が得られ GG＋Co^{++} 混液は短時間で極めて鮮明な深紅色を呈し吸収極大（max）520 mμ，吸光度（E）0.83 で，0.01 M Co^{++} の max 510 mμ，E 0.049 に比し max が 10 mμ 移動，E は約 15 倍に達し明らかに配位化合物の形成が認められた。

又 GG の NH_2 基の水素 1 個を methyl 基に代えた SG と Co^{++} の混液は GG＋Co^{++} 混液よりは遙かに薄い赤色を呈し max は GG＋Co^{++} の場合と同様 520 mμ であるが E は 0.212 で約 1/4 に過ぎず明らかに配位化合物を形成するが GG＋Co^{++} に比し生成量少なく弱い結合をなしているのではないかと考えられる。

尚 GG の NH_2 基の水素2個を methyl 基に代えた NDGG に Co^{++} を添加した場合少量のゼラチン様水酸化コバルトの沈澱を生じたが，参考の為その濾液に就いて測定した max は Co^{++} の 510 mμ と同一で E は 0.127 を示した。

又 GG の peptide N に結合する水素を methyl 基に代えた GS と Co^{++} 混液の示す max は 500 mμ E 0.136 で，此の混液を冷所に放置すると次第に黄色を帯び吸収が短波長に移動し E が増大する傾向が見受けられた。

又 GG の COOH 基を閉塞した GG amide は Co^{++} と明らかに配位化合物を形成し max は GG $+Co^{++}$ の場合より 40 mμ も短波長に移動し，480 mμ，E 0.335 を示す。

2） glycylglycine 誘導体と Mn^{++}, Mg^{++} の関係

上記 GG，SG，NDGG，GS の各濃度 0.125 M 溶液を 5 cc のメスフラスコに各 2 cc 取り，0.01 M の $MnCl_2$，$MgCl_2$ 溶液を 2 cc 加え 0.25 N の NaOH で pH 7.8 に補正，全液を 5 ccに稀釈し25°c の恒温器中に 20 時間放置後 spectrophotometer で E を測定し結合の有無を検討した。又 GG amide は 0.02 M 溶液に 0.002 M の塩類溶液を加え同様に処理し 40 時間同一条件に放置し測定に供した。

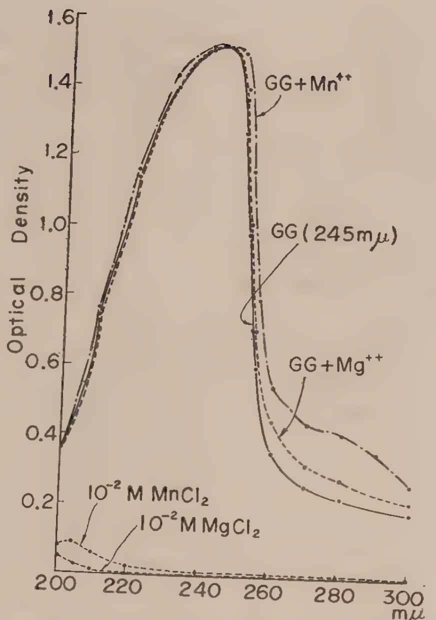


Fig. 1. Absorption curves of sample mixtures containing glycylglycine (0.125M) and Mn^{++}, Mg^{++} (each 0.01 M) at pH 7.8 after 20 hrs. at 25°C.

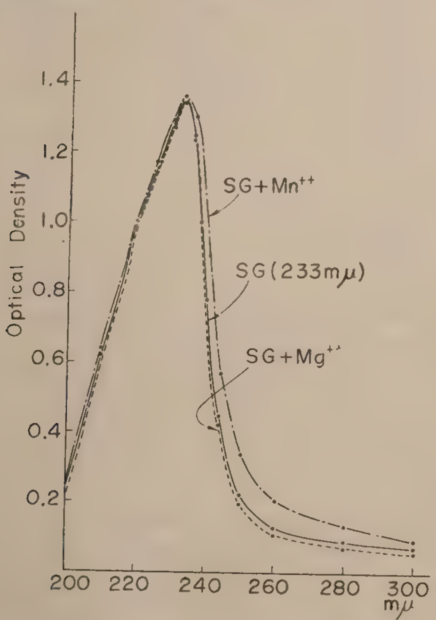


Fig. 2. Absorption curves of sample mixtures containing sarcosylglycine (0.125 M) and Mn^{++}, Mg^{++} (each 0.01 M) at pH 7.8 after 20 hrs. at 25°C.

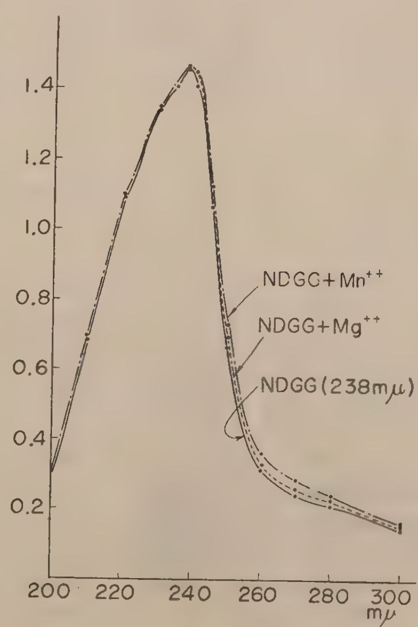


Fig. 3. Absorption curves of sample mixtures containing N-dimethylglycylglycine (0.125 M) and Mn^{++}, Mg^{++} (each 0.01 M) at pH 7.8 after 20 hrs. at 25°C.

尚此の場合Mn^{++}とGG，SG，NDGG の混液は極く微量の白色沈澱を生じ，時間の経過と共に褐色に変化し水酸化マンガンと思はれる沈澱を生じCo^{++}，Mg^{++} の場合と同一に論じ得られないが之は濾過し，その濾液に就いて観察したが明らかにCo^{++}，Mg^{++}の場合とは異なる吸収曲線が得られたので此の濾液に対する結果を考察した。

即ち Fig.1 はGG 単独及び GG+Mn^{++}，GG+Mg^{++} 混液の吸収曲線を示したものであるが，GG はmax 245mμ，E 1,514 で極めて sharp な吸収曲線を示し，GG+Mn^{++}混液の max は245mμ，E 1.52 で殆んど GG 単独のものと一致するが，max より長波長部に移行するに従いEが少しづつ増大し GG とは異なる吸収曲線を示し弱い結合がなされているのではないかと推定されるが GG+Mg^{++} 混液の max は245mμ，E 1,518 で吸収曲線は殆んど GG 単独のものと一致するが 260mμ附近からEが幾分増大する傾向が見受けられた。

又 Fig.2 は SG 単独の吸収曲線と SG+Mn^{++}，SG+Mg^{++}混液の吸収曲線を示したものであり SG 単独の max は 233mμ，E1.34，又 Mn^{++}及びMg^{++}との混液の max は何れも同一波長，Eは夫々 1.36，1.35 で三者殆んど一致するが，max より長波長部に於てMn^{++}との混液の示すEが少しづつ増大するに反しMg^{++}

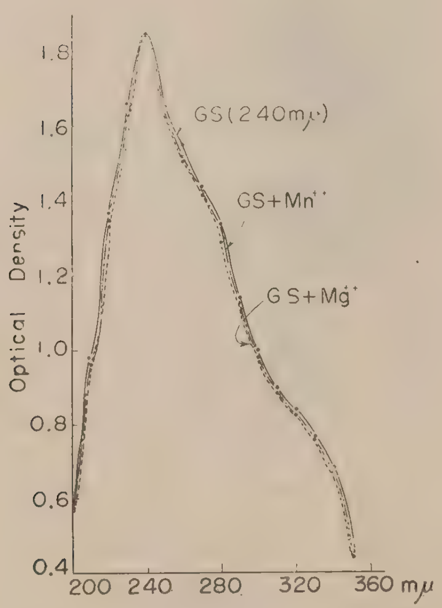


Fig. 4. Absorption curves of sample mixtures containing glycylsarcosine (0.125M) and Mn^{++}, Mg^{++} (each 0.01M) at pH 7.8 after 20 hrs. at 25°C.

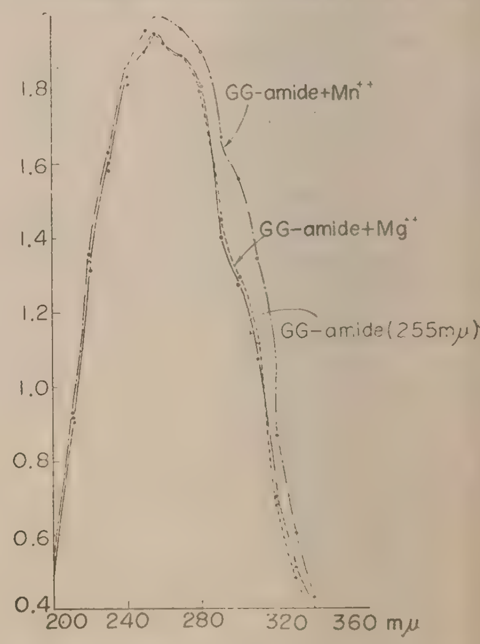


Fig. 5. Absorption curves of sample mixtures containing glycylglycinamide (0.02M) and Mn^{++}, Mg^{++} (each 0,002M) at pH 7.8 after 40 hrs. at 25°C.

との混液はSG 単独のものと殆んど一致した吸収曲線を示し SGとMn^{++}との弱い結合は推定されるがMg との結合は全く認められなかつた。

又 NDGG 単独の吸収曲線と NDGG+Mn^{++}，NDGG+Mg^{++} 混液の示す吸収曲線は Fig. 3 に示す如くで NDGG 単独の max は 238mμ，E 1,452，又 Mn^{++}及びMg^{++}混液の max 並びに Eは何れも 238mμ E 1.46 で吸収曲線は三者殆んど一致し，又 GS 単独の max は 240mμ，E 1.85 で，Mn^{++}，Mg^{++} との混液も全く之と同一吸収曲線を示し (Fig.4)，NDGG 及び GS と Mn^{++}，Mg^{++} との配位化合物の形成はなされないものと認めた。

又 GG amide 単独の max は 255mμ，E 1.95 で，GGamide+Mn^{++}，GGamide+Mg^{++} の max は 255 mμ，E は夫々 2.0，1.95 であるが max より長波長部に於て Mn^{++} との混液は明らかに増大する。然る

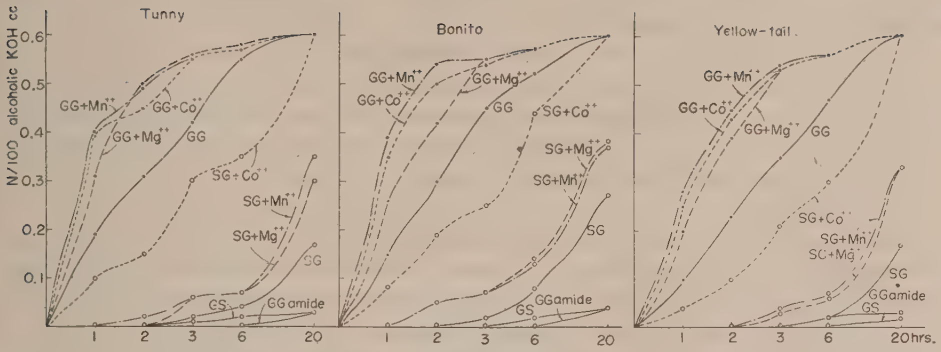


Fig. 6 Effects of metal ions on the hydrolysis of glycylglycine derivatives by the glycylglycine dipeptidase, prepared from the pyloric caeca of tunny, bonito and yellow-tail. The experiments were performed at 37±1°C in 0.1M ammonium buffer at pH 8.0 with a substrate concentration of 0.03M and in the presence of 0.001M Co^{++}, Mn^{++} and Mg^{++} respectively. 0.6cc of N/100 alc. KOH=100% hydrolysis of peptides.

一方 Mg^{++} との混液は, GGamide 単独の吸収曲線と殆んど一致し, Mn^{++} との結合は推定されるが Mg^{++} との結合は認められなかつた (Fig.5)。

3. 酵 素 試 験

上記 GG 誘導体を基質とし実際に酵素試験を試みた。此の際基質としてはGG, SG, NDGG, GS, GG amide を最終濃度 0.03M になる如く 0.1 N ammonium buffer (pH 8.0) に溶解したものを用い又塩類溶液は $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ を最終濃度各 10^{-3}M になる如く調製したものを用いた。

又酵素液はマグロ *Thunnus orientalis* Temminck et Schlegel, カツオ *Katsuwonus pelamis* Linne, ブリ *Seriola quinqueradiata* Temminck et Schlegel の幽門垂を前報 [11,12] の如く磨砕後其の一定量に3倍量の蒸溜水を加え一昼夜放置後硅藻土の薄膜を作つた濾紙で吸引濾過し, 得た透明酵素液の 10cc を用いて調製した 60% acetone 乾燥粉末を 5cc の 0.1 N ammonium buffer (pH 8.0) で抽出し, 之を酵素液とし, 前報同様の方法 [11,12] により酵素試験を行つた。

Fig. 6 はマグロ, カツオ, ブリ幽門垂中の GG dipeptidase の酵素力を N/100 alc. KOH の cc 数で表はしたものである (N/100 alc. KOH 0.6cc=100% 加水分解)。

即ち何れの場合も GG の加水分解は前報同様10^{-3}M Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} により著しく賦活される。又 SG の加水分解はマグロの場合塩類無添加では6時間で 6.6% 分解されるのに対し, Co^{++} 添加のものは 58.3%, Mn^{++}, Mg^{++} の添加で11.6% 分解し, 20時間では塩類無添加 28.3%に対し Co^{++} 添加のものは 100%, Mn^{++} 添加のものは 58.3%, Mg^{++} の場合は50%分解する。

カツオ, ブリの場合も同様な傾向を示し, カツオの場合 20時間で塩類無添加 45% 分解に対し Co^{++} 添加のものは100%, Mn^{++} 添加のものは 61.6%, Mg^{++} 添加のものは 63.3%分解する。又ブリの場合は20時間で塩類無添加 28.3%に対し Co^{++} 添加のものは 100%, Mn^{++}, Mg^{++} 添加のものは何れも55%分解する。

以上の如く何れの場合も SG それ自体が GG より弱いが多少加水分解され且 Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} の添加による賦活が認められた。

尚 GS はマグロ, カツオ, ブリ何れの場合も殆んど分解されず, 20時間で5～6%分解されるに過ぎない。且Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} を添加しても変化なく, GG amide の場合も殆んど分解されず, 20時間で 3～6% 分解, Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} を添加しても影響なく, 又 NDGG も同様加水分解されず且 Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} を添加しても賦活されなかつた。

考　　察

基質 GG が Co^{++} 及び Mn^{++} と配位化合物を形成し而も GG dipeptidase の作用が 10^{-3}M Co^{++}, Mn^{++}

の添加により著しく賦活される点明らかに enzyme-substrate 配位化合物の形成に際し Co^{++}, Mn^{++} が両者間に橋渡しの役割をなしているものと思はれる。

即ち GG の遊離 NH_2 基の水素1個を methyl 基で閉塞した SG の Co^{++} との結合は GG+Co^{++} の結合より弱く, GG dipeptidase による加水分解も GG に比し遙かに少ない。而も Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} の添加により分解が増大されるが, 遊離 NH_2 基の水素2個を methyl 基で閉塞した NDGG は全く分解されず, Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} の添加によつても何等影響なく, 同酵素に対し基質 GG の遊離 NH_2 基の存在が必要であり, Co^{++} との配位の際も同様 NH_2 基の必要が推定される。又 Mn^{++} との場合も恐らく同様な条件を必要とするものと推定される。

又 peptide N に結合している水素を metlyl 基で閉塞した GS は Co^{++} と弱く配位するが Mn^{+} とは配位化合物を形成しない。一方 GG dipeptidase により殆んど加水分解されず而も 10^{-3}M Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} を添加しても分解が促進されない点等から GG の加水分解には CONH の水素を必要とする事は明らかであり又 Co^{++} 及び Mn^{++} が GG と配位する際も同一条件を必要とするものと推定される。

又遊離 COOH 基を閉塞した GG amide は Co^{++} と配位し, 一方 Mn^{++} とも弱く配位するに拘らず GG dipeptidase により殆んど加水分解されず, 20時間で約3.3～6.6%分解されるに過ぎず, 而も Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} を添加しても賦活されず GG の分解には COOH 基を必要とする点明らかであるが, 此の COOH 基が直接酵素蛋白との結合に関与するものか, 或いは Co^{++}, Mn^{++} との配位を通じて結合に関与するものか決定し得られない。然し閉塞に用いた amide 基が其の性質上金属置換体を形成する活性基でもあり glycyl-L-leucinamide との配位の如く GG amide に於ける amide 基が Co^{++}, Mn^{++} との配位に関与したものと考えられ, Co^{++}, Mn^{++} との配位にも COOH 基が必要である事が推定される。

結局以上の結果から Co^{++} の賦活機構に関しては Smith [6,9] と同一機構が考えられるが, 唯 Co^{++}-enzyme に於て酵素蛋白分子中の SH 基が此の結合の一部に関与しているらしく [25,26] 又 Mn^{++} の場合 GG, SG, NDGG 混液が前述の如く極く微量の水酸化マンガンと思はれる沈澱を生ずる為結果は明確ではないが其の濾液に就いての結果から考察し恐らく Mn^{++} の場合も同様 enzyme-Mn^{++}-substrate 配位化合物の形成により賦活するものと推定される。

唯 Mg^{++} は GG, SG の分解を賦活し GG とは極く弱く配位するものとも推定されるが SG, NDGG GS, GG amide とは配位化合物を形成せず, Co^{++}, Mn^{++} に比し基質反応基に対するよりも恐らく酵素自体に多く関係するものであろうと考えられる。

要　　約

幽門垂 GG dipeptidase の Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} による賦活機構を解明する一手段として GG の NH_2, CONH, COOH を夫々閉塞した sarcosylglycine, N-dimethylglycylglycine, glycylsarcosine, glycylglycinamide を合成し, 基質反応基と Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} の配位の有無を spectrophotometer で観察し, 酵素の分解力と併せて検討した結果

1. カツオ, マグロ, ブリ幽門垂から得た GG dipeptidase 標品は GG を強く, SG を弱く分解したが他の GG 誘導体を分解せず, 又その GG dipeptidase は Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} で賦活されたが Mn^{++}, Mg^{++} は同程度で, Co^{++} はそれよりも強く賦活した。

2. 供試した GG 誘導体と Co^{++} の混液の吸収帯の変化は Smith の観察した所と一致し, Smith 同様 Co^{++} は enzyme-Co^{++}-substrate 配位化合物の形成により GG dipeptidase 作用を賦活するものと推定された。

3. GG 誘導体と Mn^{++} の混液は Co^{++} の場合程顕著な吸収帯の変化は認められなかつた。唯 GG, SG, GG amide の場合長波長に於て多少の変化があつた。

4. 一方 Mg^{++} の場合, GG とは長波長部に於て多少の変化があつたが他の GG 誘導体との混液の吸収帯には変化は認められなかつた。

文　　献

1) J. Berger, M. J. Johnson : *J. Biol. Chem.*, **130**, 641, 655 (1939).

2) J. Berger, M. J. Johnson : *J. Biol. Chem.*, **133**, 157 (1940).

3) E. Maschmann : *Biochem. Z.*, **319**, 28 (1941).
4) M. J. Johnson, J. Berger : *Advances in Enzymol.*, **2**, 69 (1942).
5) E. L. Smith : *J. Biol. Chem.*, **173**, 553, 571 (1948).
6) E. L. Smith : *J. Biol. Chem.*, **176**, 21 (1948).
7) 佐藤正一外：農化, **28**, 740 (1945). **29**, 894 (1955). **30**, 608 (1956)
8) 井口信義・山本喜志郎：農化, **29**, 394 (1955).
9) J. B. Sumner : *The Enzymes*, Vol. 1, Part 2, 817 (1951).
10) E. L. Smith : *Enzymes and Enzyme Systems*, 47 (1951).
11) 斗ケ沢宜久・勝又悌三：岩手大学農学部報告, **2**, 66 (1954).
12) 斗ケ沢宜久・勝又悌三：本誌, **21**, 1070 (1956).
13) P. A. Levene, H. S. Simms, M. H. Pfaltz : *J. Biol. Chem.*, **61**, 445 (1924).
14) M. Bergmann, L. Zervas, H. Schleich, F. Leinert : *Z. physiol. Chem.*, **212**, 72 (1932).
15) 山下忝平外：農化, **27**, 649 (1953). **28**, 672, 674 (1954).
16) J. C. Sheehan, D. W. Chapmann, R. W. Roth : *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3822 (1952).
17) J. C. Sheehan, V. S. Frank : *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 1856 (1949).
18) R. A. Turner : *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2388 (1953).
19) J. H. Billmann, W. F. Hartung : *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1473 (1948).
20) 志村憲助：標準生化学実験, 581 (1953).
21) M. Bergmann, L. Zervas : *Ber.*, **65**, 1192 (1932).
22) J. S. Fruton, M. J. Bergmann : *J. Biol. Chem.*, **145**, 253 (1942).
23) Z. Hillmann : *Naturforschung*, **1**, 682 (1946).
24) E. L. Smith, W. Polglase : *J. Biol. Chem.*, **180**, 1209 (1949).
25) 斗ケ沢宜久：本誌, **23**, 105 (1957).
26) 斗ケ沢宜久：本誌, **23**, 109 (1957).

魚体のコハク酸脱水素酵素に関する研究—III. 酵素活性度と pH との関係について

福田博業・黒木　暘
（宮崎大学農学部水産化学教室）

Studies on the Succinic Dehydrogenase of Fish—III. Influence of pH for the Activity of Succinic Dehydrogenase of Fish-Tissues

Hironari Fukuda and Akira Kurogi

The optimum pH for succinic dehydrogenase activity of liver and dark muscle of several kinds of fish was found to be 6.7±0.1. Practically no difference in the optimum pH was observed between species of fish or kind of tissue.

The change of the activity with pH is shown in Fig. 1. It is clearly seen that the activity changes appreciably with pH in acidic side from the optimum pH while changes gradually in alkaline side.

魚体組織に含まれるコハク酸脱水素酵素（以下 Suc. DH と記す）の酵素活性度と pH との関係については研究がなく，至適 pH も明かにされていない。従来 Suc. DH の活性度測定は多く pH 7.4～7.8 附近の弱塩基性において行われているが，これは必らずしも酵素活性度の至適 pH とは一致していないようである。著者は先に報告した方法[1]により 2, 6-Dichlorophenolindo-*o*-chlorophenol（DPICP と略記す）を用い，魚体の肝臓および血合肉中に含まれる Suc. DH の酵素活性度と pH との関係を測定した。その結果は従来哺乳動物の心筋や細菌中の Suc. DH について報告されている結果と異つた結果を与えたので，それについて報告する。

実　　験

I. 酵素液の調整　著者が先に報告した方法[1]によつた。すなわち魚体組織（肝臓および血合肉）の一定量に少量の水を加え，氷冷しながら homogenize したのち水を加えて 10 倍量とする。この 10% homogenate を二重ガーゼを用いて漉し均質な酵素懸濁液として測定に供した。活性度測定に際して反応系に加えた酵素液量 *a* は 0.2～0.5 ml の範囲内であつた。

II. 測定法　活性度測定法は前報[1]と同様であつて用いた反応系の組成は次の通りである。

0.1 M $KH_2PO_4-Na_2HPO_4$ buffer soln.	(5.7−*a*) ml.
0.1 M Na−Succinate	2.0 〃
0.1 M KCN	0.3 〃
0.1 mM Dichlorophenolindo-*o*-chlorophenol dye soln.	2.0 〃
Enzyme soln. (10% homogenate, n=10)	*a* 〃
Total volume of reaction system	10.0 〃

Reaction temp. 20°C, Reaction time 10～60 min, Filter 660 mμ.

上記の反応系において燐酸塩緩衝液の pH のみを変化して酵素活性度 E を測定した。反応液の各温度は常に 20 ± 1°C に保ち，反応の starter として酵素液 *a* ml を加え，反応系における吸光度変化を測定し，酵素活性度を計算により求める。その結果から至適 pH を求めた。pH の測定は Beckman 型 pH 計

1957 年 8 月 26 日受理

を用い 0.01 の精度で測定した。反応系の pH は活性度測定の直後に測定した。

実験結果と考察

新鮮な魚体の肝臓，血合肉などについて Suc. DH の酵素活性度に及ぼす pH の影響を測定し，その結果を Fig. 1. に示した。なお比較のために同様の方法により牛の肝臓，腎臓などについて測定した結果を

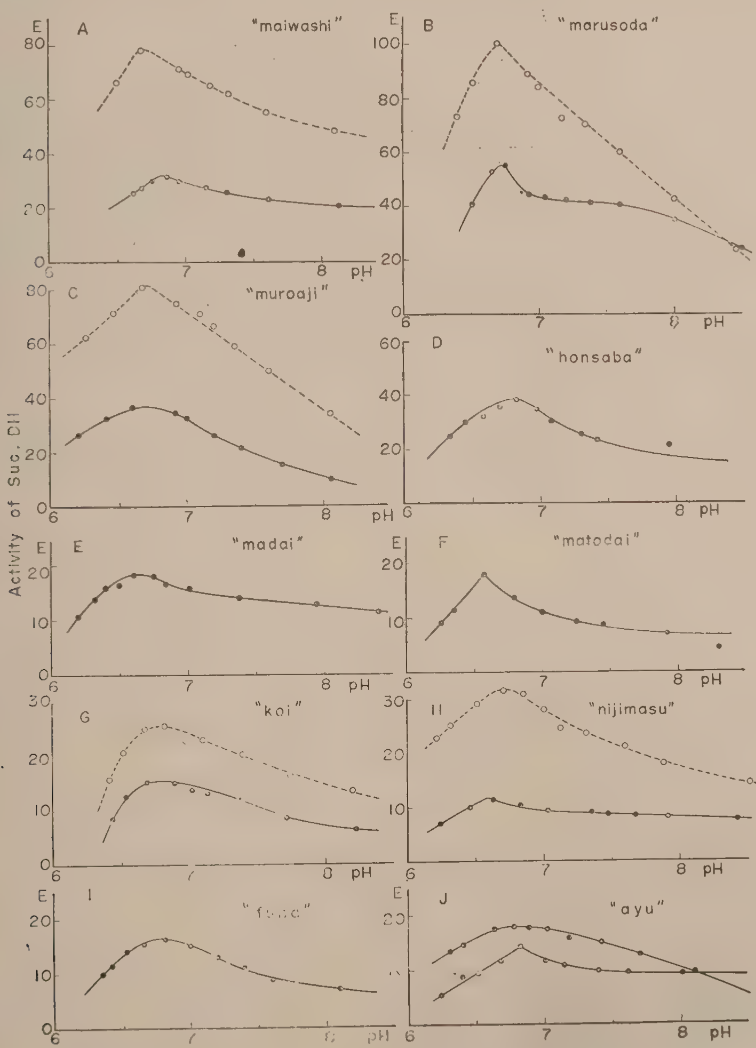


Fig. 1. The influence of pH on the activity of Suc. DH of fish.
……○……○……○…… dark muscle ——●——●——●—— liver,

A. *Sardinops melanosticta*, "maiwashi"
B. *Auxis tapeinosoma*, "marusoda"
C. *Decapterus muroadsi*, "muroaji"
D. *Scomber japonicus*, "honsaba"
E. *Chrysophrys major*, "madai"
F. *Zeus japonicus*, "matodai"
G. *Cyprinus carpio*, "koi"
H. *Salmo gairdnerii irideus*, "nijimasu"
I. *Carassius auratus*, "funa"
J. *Plecoglossus artivelis*, "ayu"

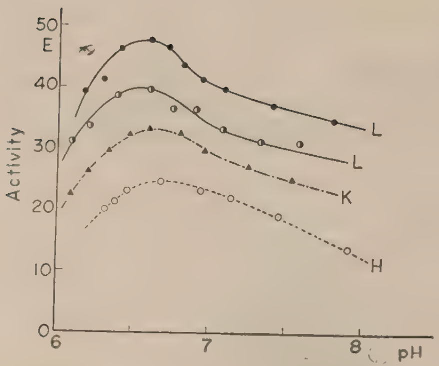


Fig. 2. The influence of pH on the activity of Suc. DH of beef.
L liver, K kidney, H heart

Fig. 2. に示す。これらの結果についてみると，魚種により多少の差異はあるけれども，ほぼ∧型の曲線型をなし明らかな至適 pH を表わしている。これらの一般的な傾向として，至適 pH よりも酸性側においては酵素活性度の変化が著しく，pH 5 附近においては殆んど完全にその作用力を失うものとみられるに反し，塩基性側においては pH 変化に伴う酵素活性度の変化は比較的ゆるやかで，pH 8 を超えてもなお相当の活性度を有している。その原因は酵素蛋白質の属性に関係するものと考えられる。Fig. 1. に示した測定結果から，それぞれの至適 pH を求めると Table 1. に示すように，その殆んど全部が pH 6.6～6.8 の間に最大の酵素活性度を表わしている。そうしてこの値は魚の種類によつても，魚体部位の組織別によつても特別の差異は認められない。また海産魚類と淡水産魚類との間にも特別の差は認められない。

Table 1. Optimum pH of Suc. DH of fish and beef.

Species	Tissues	Liver	Dark muscle
Sardinops melanosticta	" maiwashi "	6.8	6.7
Auxis tapeinosoma	" marusoda "	6.75	6.7
Decapterus muroadsi	" muroazi "	6.7	6.72
Scomber japonicus	" honsaba "	6.8	／
Chrysophrys major	" madai "	6.65	／
Zeus japonicus	" matodai "	6.6	／
Cyprinus carpio	" koi "	6.8	6.8
Salmo gairdnerii irideus	" nizimasu "	6.6	6.7
Carassius auratus	" funa "	6.75	／
Pleloglossus artiveris	" ayu "	6.8	／
(range)		6.6～6.8	6.7～6.8
Bos taurus var. domesticus	" *Ushi* "	6.6	

このような結果は従来の文献に徴して一見意外のようであるけれども，酵素蛋白質の属性としてみるならばむしろ当然の結果であると考えられる。

測定した硬骨魚類の Suc. DH の至適 pH が従来報告されている哺乳動物の心筋[2),3),4)]，あるいは細菌[2)]のそれと著しく異なつている。しかし生体内における Suc. DH が Krebs-cycle 中の重要な役割をになつていることからして，その至適 pH が 8～9 という高い pH 値にあるということよりもむしろ，著者が測定した結果のように 6.7 内外の生理的 pH 値を示すことの方が妥当であろうと考えられる。

このような相異が，生物の種類による本質的差異によるものであるか，あるいはまた測定法に原因する差異であるかを検するために，魚類の場合と同様の方法により牛の肝臓，腎臓などについて Suc. DH の活性度変化を測定し，至適 pH を求めた。その結果は Fig. 2. に示すように，魚類の場合と殆んど同様であつた。従つて，古い文献における Suc. DH の至適 pH が 8～9 とされているのは測定法の不備によるためであろうと考えられる。

著者がここに用いた方法は従来の測定法に優る方法であつて，測定中に酸素の影響を受けないばかりでなく，測定時間が甚だしく短い（60 sec. 以内）迅速測定法であるから，測定中の酵素の失活，測定中の条件変化の影響などが少ない。故に測定された結果も酵素本来の性質に近いものであろうと考える。

なお，従来の Suc. DH 測定法においては，[5)-7)]多くの場合 pH 7.3〜7.4 内外の燐酸緩衝液を添加 しているけれども，反応系そのものにおける pH については殆んど考慮が払われていない。然し Fig. 1. の結果からみても明らかなように，反応系における僅かの pH 変化によつても測定される酵素活性度に可なりの差異を生ずるから，反応系の pH を一定に規定しておく必要がある 。実際の測定においては緩衝液の他に反応系に加えられる Na-succinate, KCN などが何れも強い塩基性塩であるために，反応液の pH は常に塩基性側に移動する。従つて反応液の pH を至適 pH 附近に保つためには，予定される pH よりも幾分酸性の緩衝液を加える必要がある。これらの点についてはすでに測定条件の項においてのべたところである。

要　　約

1. 魚体の肝臓および血合肉における Suc. DH の活性度と pH との関係について測定を行い，なお比較のために牛の肝臓，腎臓，心臓などについても同様の測定を行つた。

2. 魚体の Suc. DH の至適 pH は 6.7 ± 0.1 の間であつた。

3. 牛の肝臓，腎臓，心臓などの Suc. DH についても 魚の場合と同様に至適 pH 6.7 内外に測定された。

4. 魚の種類，器官組織の種別などによる特別の差異は認められなかつた。淡水魚と海水魚との間にも特別の差異はない。

5. Suc. DH の酵素活性度に対する pH の影響は一般に∧型曲線の関係で示される。しかも 各々の至適 pH の酸性側においては pH に伴う活性度変化が急であるのに対して，塩基性側においてはこの変化が比較的に緩やかであつて，pH 8 以上の塩基性においてもなお相当の活性度を保持する。

終りにこの研究の一部は文部省綜合科学研究費『血合肉の生化学的研究』によつた。記して謝意を表す。なお原稿の校閲をしていただいた九州大学富山哲夫教授に対して感謝する。

文　　献

1. 福田博業 ; 本誌, **23**, 547, (1958).
2. Ohlsson E. ; *Skaud. Arch. Physiol.*, **41**, 77 (1921).
3. Cook R. P. and Alcook R. S. ; *Biochem. J.*, **25**, 523 (1931).
4. Laki K. ; *Z. Physiol. Chem.*, **254**, 25 (1938).
5. Neufeld, H. A. et. al., ; *J. Biol. Chem.*, **210**, 869 (1954).
6. Slater E. C. and Bonner W. D. ; *Biochem. J.*, **52**, 185 (1952).
7. Keilin D. and Hartree E. F. ; *Biochem, J.*, **41**, 500 (1947).

魚体のコハク酸脱水素酵素に関する研究—Ⅳ. 酵素活性度と温度との関係について

福田博業・黒木 暘
(宮崎大学農学部水産化学教室)

Studies on the Succinic Dehydrogenase of Fish——Ⅳ. The Influence of Temperature for the Activity of the Enzyme of Fish and Beef

Hironari FUKUDA and Akira KUROGI

The influence of temperature on the activity of succinic dehydrogenase of fish and cattle was estimated by means of electro-photometric method with Na-2, 6-dichlorophenolindo *o*-chlorophenol.[1] The succinic dehydrogenase activity of liver and dark muscle in many fish was almost inactive at 0°C, gradually increased its activity with rise of temperature, but suddenly lost its activity at 50—55°C presumably due to the heat denaturation of the enzyme protein(Fig. 1).

The temperature activity curve of succinic dehydrogenase in liver and kidney of cattle was found to be different that of the enzyme of fish. In case of the cattle succinic dehydrogenase the change of activity was relatively small in a low temperature range, but was appreciablly great above the body-temperature(Fig. 2).

The temperature-activity relationship can be clearly seen from Fig. 3, that illustrates the variation of the temperature coefficient of the enzyme activity.

魚体のコハク酸脱水素酵素（以下 Suc. DH という）に対する温度の影響については研究が見当らない。一般に変温動物のもつ酵素は高等な恒温動物のもつ酵素よりも至適温度が低く，しかも熱に対する安定度も比較的に低い例がみられる。例えば著者が先に行つた魚体カタラーゼに関する研究結果[2)3)] からも明らかにこの事実が認められ，また硬骨魚類の中でも温水性魚類と冷水性魚類とでは明らかな相異が認められた。然るに本研究における Suc. DH の場合にはこのような事実は認められなかつた。以下それらの結果について報告する。

実 験 方 法

1. 酵素液の調製 前報[1)] と同様の方法で調製した 10 % homogenate (n=10) を酵素液として用いた。反応系 10 ml に対する酵素液の添加量（*a*）は 0.2～0.5 ml であつた。

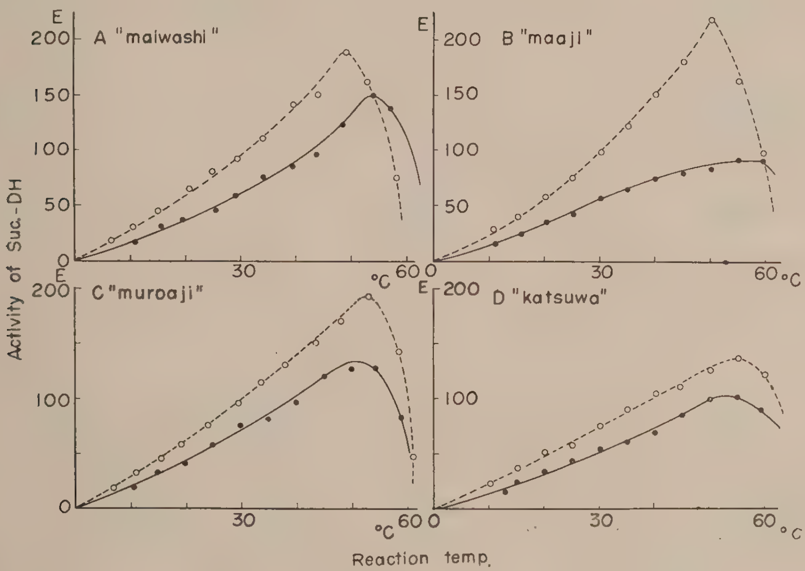
2. 測 定 法 活性度の測定法は前報[1)] と同様であつて，反応系の組成も同様である。反応液の pH は至適 pH である 6.7 ± 0.1 になるように調節した。

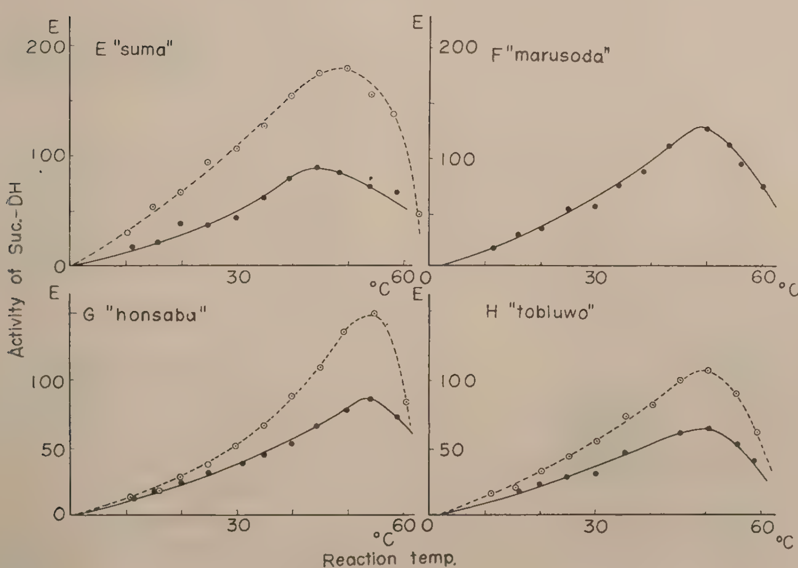
温度による酵素活性度の変化は次のようにして測定した。酵素液以外の反応液の所定量を比色管にとり，温度計を挿入して定温器中に立てる。管内の液温が所定の反応温度よりも 2, 3°C 高めに達したとき取出し温度を見ながら放冷し，液温が所定の反応温度よりも 1°C だけ高い温度に達したとき温度計を抜きとり，予め用意した酵素液 (n=10) の所定量 *a* ml を手早やく加え速やかに振盪して反応をスタートせしめてのちの吸光度変化を測定し活性度 E を求めた。反応時間は 10～60 sec. 以内であつたから測定中の温度変化は小であるが，外気との温度差の著しいときは ± 1°C 以上の温度変化が避けられないので，測定終了直後の液温を迅速に測定しその反応系における反応温度と見做した。測定結果を示した Fig. 1 中の測定温度はすべてこの反応終了直後の反応系の温度を示したものである。

1957 年 8 月 26 日 受理

実験結果と考察

数種の魚体について測定した結果を Fig. 1 に示す。比較のため測定した牛の場合を Fig. 2 に示す。図中の酵素活性度 E の値は組織 1 g に相当する Suc. DH 活性度の単位数を表わし，反応温度は測定終了直後の反応液温度を表わしたものである。





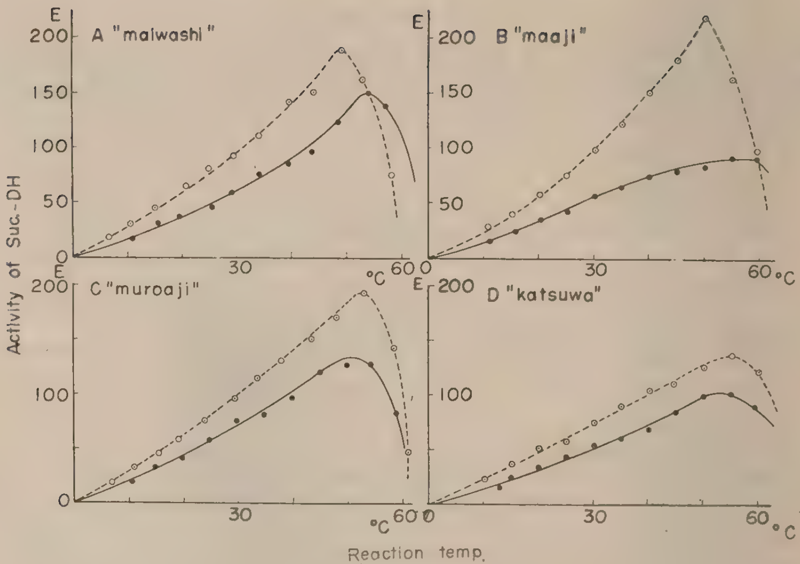


Fig. 1 The influence of temperature on the activity of Suc. DH of fish.

……⊙……⊙……⊙……dark muscle, ●——●——● liver, ○……○…… ordinary muscle,

A. Sardinops melanosticta, "maiwashi" *B. Trachiurus japonicus*, "maaji"
C. Decapterus muroadsi, "muroaji" *D. Katsuwonus selamis*, "katsuwo"
E. Euthynnus affinis yaito, "suma" *F. Auxis tapeinosoma*, "marusoda"
G. Scomber japonicus, "honsaba" *H. Prognichthys agoo*, "tobiuwo"
I. Chrysophrys major, "madai" *J. Zeus japonicus*, "matodai"
K. Cyprinus carpio, "koi" *L. Salmo gairdnerii irideus*, "nijimasu"

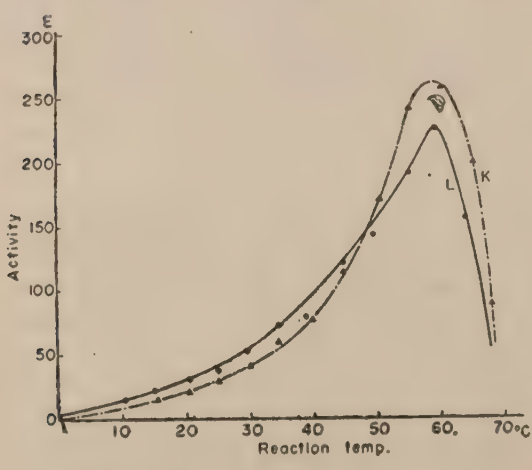


Fig. 2 The influence of temperature on the activity of Suc. DH of beef.
L——●——●——●—— liver, K——▲——▲—— kidney,

Fig. 1 の結果についてみると，各魚種においてほぼ同様の傾向を示している。すなわち50～55 °C までは温度の上昇とともに次第に酵素活性度を増加するのが，この温度を越えると急激に作用力を低下する 。

Suc. DH の活性度は 0°C において殆んど 0 である。このことは多くの魚類においても牛の場合と同様であつて， 0°C では生体内における Suc. DH 作用が完全に停止することを示している。この事実は生体内の酸化還元代謝系における Krebs-cycle の連鎖が 0 °C で殆んど完全に停止することを意味するものと考える。ところが淡水魚類特に冷水性淡水魚（例一ジマス）の肝臓では 10°C でなお可なり強い酵素活性度を示し， 0°C でなお幾分の酵素活性度を有するものと推定されることは興味がある。このことは冷水魚では外界水温が 0°C に近い低温となつた場合でもなお生活力を有する事実と併せ考えて興味深い。この問題は魚類の生態と生化学との関連を示す一つの手掛かりとなるものと考えられるが測定例が少ないので断定は避けておく。

次に 0°C から50° C までの温度においては，温度の上昇するに伴つて次第に作用力を増加する。その増加の度合は魚類の場合は比較的にゆるやかであつて，Fig.1 に示した活性度／温度曲線はほぼ直線に近い場合が多い。温度係数 Q_{10} の値もほぼ一定に近い。(Fig. 3) この点，魚類の場合は哺乳類（例ウシ）の場合と著しく趣を異にする。魚類では外界水温の変化に順応して生活する必要があるために，外界の水温変化に伴つて起る体内酵素の活性度変化が比較的に緩慢であるという事実は極めて合理的である。また外界水温が 40 °C を越えるということは事実としてあり得ないことなので，40 °C 以下において活性度の温度係数の変化が極めて小さいということも有意な事実と考える。(Fig.3)

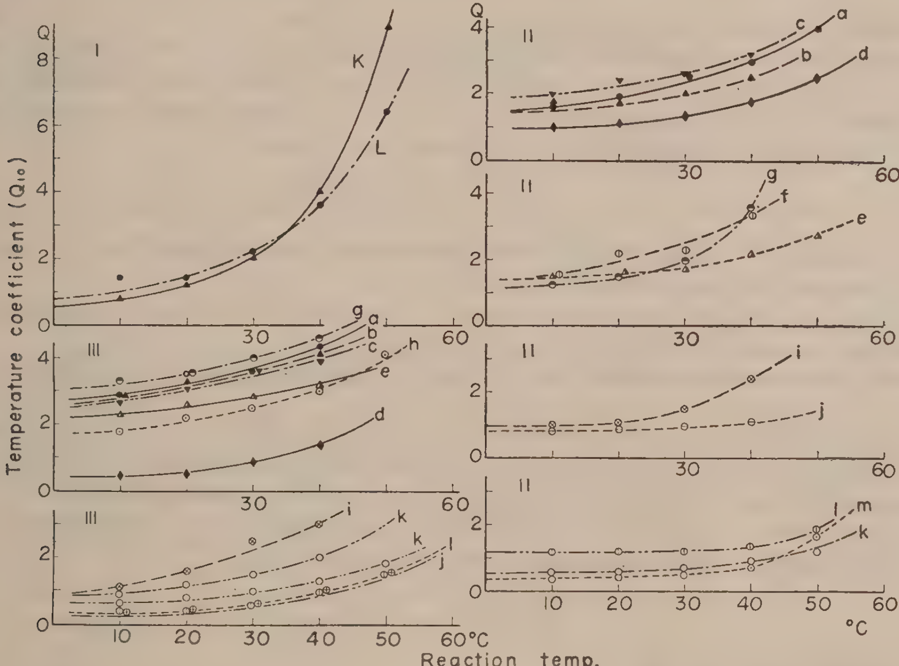


Fig.3 The variation of the temperature coeffient (Q_{10}) of Sue. DH of oish and beet.
I……liver and kidney of beef, II……liver of fish, III……dark muscle of fish.

a. Sardinops melanosticta, "maiwashi" *b. Trachiurus japonicus*, "maaji"
c. Decapterus muroadsi, "muroaji" *d. Scomber japonicus*, "honsaba"
e. Katsuwonus selamis, "katsuwo" *f. Auxis tapeinosoma*, "marusoda"
g. Euthynnus affinis yaito, "suma" *h. Cololabis saira*, "sanma"
i. Prognichthys agoo, "tobiuwo" *j. Chrysophrys major*, "madai"
k. Cyprinus carpio, "koi" *l. Salmo gairdnerii irideus*, "nijimasu"
m. Plecoglossus altivelis, "ayu"

これに対して恒温動物（例ウシ）の場合には，Fig.2 に示したように，その体温（約40°C) 以下の温度においては活性度 Eの変化は比較的に小であつて，温度係数 Q_{10} の値の変化も少ない。しかるに約40°Cを越えると急激に活性度を増加し，Q_{10} の値も急増してゆく。このことは哺乳類の体温がほぼ一定であつて体温を越えた温度条件は病的以外にあり得ないという事実と関連するものであると考える。

次に Suc. DH の熱失活温度であるが，魚類の場合では，(Fig.1)，殆んど例外なしに 50～55 °C で最高の活性度に達し，その温度を過ぎると急激に活性度を低下し，55～60°C で殆んど完全に作用力を失う。これは明らかに酵素蛋白質の熱変性によるものであつて，反応液中に蛋白質の沈澱が起る。ウシの場合にはこの熱失活温度が比較的に高く，60 °C 附近で最高の活性度を示し，約70 °C で殆んど完全に作用力を失う。以上の事実もまた動物の種類によつて酵素の属性に差異のあることを示すものであつて，魚類の Suc. DH

の熱失活温度が低いことは，魚類の体蛋白質の熱凝固温度が比較的に低いことと関係があるように思われる。

以上のように魚類と哺乳類（例ウシ）との間に酵素の性質に幾分の差異のあることはむしろ当然であつて魚類のような変温動物においては外界温度の変化に順応して体内における生化学的機作を緩やかに変化せしめるための適応の結果であろうと考えられる。これに対して牛のような恒温動物においては，体温の変化が極めて少ないために温度変化に対する適応の幅が狭いことを示すものであると考える。

魚類の種類による差異は特に認められなかつた。冷水性魚類と温水性魚類との間にも特別の差異は認められない。ただ前述のように，ニジマスの例で0°C近い低温においてなお多少の活性度を示した点が特異的であつた。

温度変化に伴う活性度の増加を示す温度係数 Q_{10} の値をみると (Fig. 3)，カツオ，マイワシなどの回游性魚類とマダイのような非洄游性魚類との間に一般的な差が見られる。例えば20°→30°Cの温度係数を比較すると，洄游性魚類の肝臓で1.5〜2.5，血合肉で2.5〜4.0の値を示しているのに対して，非洄游性魚類のそれは肝臓で1.5以下，血合肉で1.0以下の低い値を示している。これは魚種および組織別によつて酵素活性度Eの値に著しい差異があるためである。

要　　　約

1. 各種の魚体について肝臓および血合肉中の Suc. DH の活性度に対する温度の影響を測定した。同時に比較のため牛の肝臓，腎臓について同様の測定を行つた。

2. 魚類の Suc. DH は牛の場合と同様に 0°C において殆んど完全に作用力を失う。ただし淡水性冷水魚（例ニジマス）においては 10°C 以下でなお相当の酵素活性度を示した。

3. Suc. DHの熱失活温度は魚類の場合 50〜55°Cで魚類による特別の差は認められない。牛の場合は 60°C 以上で失活が起る。

4. 温度の上昇に伴う Suc. DH 活性度の増加は魚類においては比較的に緩やかであつて，しかも温度係数の変化も少ない。これに対して牛の Suc. DH では体温以下の温度においては温度上昇に伴う活性度変化は比較的に緩やかであるが，体温を越える温度では急激に活性度を増加し，温度係数の値も急増する。

終りにこの研究の一部は文部省綜合科学研究費『血合肉の生化学的研究』によつた。記して謝意を表する。
なお原稿の校閲をして戴いた九州大学富山哲夫教授に対して謝意を表する。

文　　　献

1. 福田博業：本誌，**23**，547 (1958).
2. 福田博業：本誌，**20**，506 (1954).
3. 福田博業：本誌，**20**，512 (1954).

暖冬期に於ける寒天の変敗防止に関する研究—III. "ダンカン"に関与する細菌に対する防腐剤の効力について*

藤沢浩明・助川輝武
(兵庫県水産試験場)

Studies on the Antisepsis of Agar During the Manufacturing Process in the Mild Winter—III. Bacteriostatic Effects of Antiseptics on the Causative Bacteria in the Spoilage of Agar and its Intermediate Product, "Tokoroten"

Hiroaki FUJISAWA and Terutake SUKEGAWA

For the purpose of the prevention of agar and its intermediate product, "tokoroten" from spoilage, the authors fundamentally experimented on the bacteriostatic effects of several antiseptics on the causative bacteria in the spoilage, and obtained the following results.

(1) Benzalkonium chloride, hydrogen peroxide and sodium hypochlorite inhibited remarkably the growth of an agar-decomposing bacterium at the concentration of 1/10000, and chlorotetracycline (aureomycin) and tetracycline (achromycin) inhibited fairly at the concentration of 1/100000.

Dehydro acetic acid, sorbic acid, nitro furyl acrylic amide and sodium peroxide were scarcely effective at the concentration of 1/10000.

(2) Sodium hypochlorite and hydrogen peroxide inhibited remarkably the growth of mixed culture of bacteria which were inferred as causative microörganisms of agar spoilage, and benzalkonium chloride, chlorotetracycline and tetracycline inhibited fairly.

緒　　言

関西地方に於て寒天の製造工程中にしばしば起る"ダンカン"を防止するためには，その原因菌である寒天分解細菌の繁殖を阻止すること，アガラーゼの作用を阻害すること等が考えられ，これらについては芝崎[1]，植田[2]，石松[3]等の報告がある。著者等も同様の見地から"ダンカン"防止策に資する目的で，前にアガラーゼに及ぼす防腐剤或は殺菌剤（以下単に防腐剤とする）の影響について報告したが[4]，本報告に於ては先に寒天の製造工程中に変敗したトコロテン及び寒天，汚染ヨシ簀の藁縄等から分離した"ダンカン"に関与する1種の寒天分解細菌及びその他数種の色素産生細菌に対する防腐剤の繁殖抑制効力について基礎的実験を行つた。そしてこれらの細菌に対する繁殖抑制の状態を肉眼的観察のみでなく培地の質的変化からも検討した結果，2，3の薬品については従来の報告よりも低濃度で有効であるように思われたので報告する。

報告に先だち，本稿の御校閲を賜つた東京水産大学岡田郁之助先生並びに実験材料について種々御配慮を賜つた兵庫県寒天協同組合理事長福井貞蔵氏及び終始激励を賜つた神戸大学麓禎康助教授に謹んで感謝の意を表する。またオーレマイシン，アクロマイシン，ベンツアルコニウムクロライドを寄贈された武田薬品工業株式会社並びに次亜塩素酸ソーダを寄贈された広島化学産業株式会社に対して深謝する。

1957年8月30日 受理

* 本研究の要旨は1956年10月日本水産学会秋期大会に於て発表した。

実　験　方　法

供試防腐剤：　防腐剤として次のものを使用した。デハイドロ酢酸（D.H.A.），ソルビン酸，ニトロフリルアクリル酸アミド（Z フラン，Z.F），過酸化水素，ベンツアルコニウムクロライド（B.A.C.），次亜塩素酸ソーダ，クロロテトラサイクリン（C.T.C.，オーレオマイシン），テトラサイクリン（T.C.，アクロマイシン），過酸化ソーダ。

供試細菌：　前報[5]に述べた寒天の製造工程中に変敗したトコロテン及び寒天，赤褐色に汚染された寒天製造用ヨシ簀の藁縄等から分離した“ダンカン”に関与する，1種の寒天分解細菌，寒天分解細菌及びその他数種の色素産生細菌の混合菌株を用いた。

培養基：　前報[5]と同様，トコロテン平板培地を用いた。

トコロテン液 100 cc づつを滅菌した綿栓三角フラスコに分注し，定法通りコッホ氏滅菌釜で間歇滅菌しやゝ温度が低下してから防腐剤をそれぞれの濃度に添加して充分振盪攪拌し，凝固寸前滅菌シャーレ（径 120 mm）に移し凝固させて平板培地とした。次に供試細菌の濃厚懸濁液 1 cc づつを分注し，培地の表面を一様に潤して室温に 20 日間培養し，細菌の繁殖状態を観察すると共に日寒式測定器によりゼリー強度をも測定した。

実験結果及び考察

1.　寒天分解細菌の繁殖に及ぼす防腐剤の影響

防腐剤の濃度は実用面（主として経費面）を考慮していずれも 1/10000（C.T.C.，T.C. については 1/100000）とし，寒天分解細菌の繁殖に及ぼす影響（室温 24～30°C）について観察した。その結果は Table 1 の通りである。

Table 1.　Bacteriostatic effects of antiseptics on an agar-decomposing bacterium separated from spoiled “tokoroten”, agar and other materials

Antiseptics \ Time in days		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
D.H.A.	1/10000	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Sor. A.	〃	+	+	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
Z. F.	〃	−	−	±	±	+	+	+	++	++	++	++	++	+++	++++	+++	+++	+++	++++	+++	+++
Na_2O_2	〃	±	±	+	++	++	++++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
B.A.C.	〃	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	±	±	+	+
H_2O_2	〃	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	±	±	±	±	±	±	+	+	+	+
NaOCl	〃	−	−	−	−	−	−	−	−	±	±	+	+	+	++	++	++	++	+++	+++	+++
C.T.C.	1/100000	−	−	−	−	±	±	+	+	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++++	++++
T.C.	〃	−	−	−	−	±	+	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++
Control		+	++	++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Incubation temperature, 24～30°C.
Signs（−，±，+，++，+++，++++）show degrees of bacterial growth on the medium.

B.A.C.，過酸化水素，次亜塩素酸ソーダは寒天分解細菌の繁殖を著しく抑制し，C.T.C.，T.C. もかなり抑制することが認められた。Z.F. は寒天分解細菌の繁殖をごく僅か抑制したに過ぎず，また D.H.A.，ソルビン酸，過酸化ソーダはこの濃度では殆んど繁殖抑制の効力が認められなかつた。

2.　“ダンカン”に関与する細菌群（混菌）の繁殖に及ぼす防腐剤の影響

1 の結果から寒天分解細菌に対し繁殖抑制の効力が認められた防腐剤について，今度は実際に近い条件を考慮して，混菌に対する繁殖抑制の有効濃度を求めた。

（1）　過酸化水素の効力

過酸化水素は濃度 30 %（試薬1級）のものを用い，純過酸化水素としてトコロテンに対する割合が 1/1000～1/20000 になるように添加し，それぞれ混菌の濃厚懸濁液を分注し，室温（5～18°C）に放置して細菌の

繁殖状態を観察すると共に培地のゼリー強度を測定した。肉眼的観察の結果を Table 2 に，培地のゼリー強度の変化を Table 3 に示す。

Table 2. Bacteriostatic effect of hydrogen peroxide on a mixed culture of causative bacteria in the spoilage of agar and "tokoroten"

Concentration \ Time in days	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1/ 1000	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1/ 2000	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1/ 4000	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1/ 5000	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1/ 6600	−	−	−	−	−	−	−	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/ 8000	−	−	−	−	−	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++
1/10000	−	−	−	−	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+++	+++
1/13000	−	−	−	±	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1/20000	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Control	−	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Incubation temperature, 5〜18°C.

Table 3. Effect of hydrogen peroxide on the jelly strength of "tokoroten" inoculated with the mixed culture

Time in days \ Concentration	1/1000	1/2000	1/4000	1/5000	1/6600	1/8000	1/10000	1/13000	1/20000	Control
0	490	490	490	490	520	500	520	520	510	510
5	440	450	460	470	470	450	460	450	450	350
7	450	450	460	470	460	450	450	450	450	150
10	430	430	440	450	440	440	440	440	440	130
15	380	390	400	410	400	400	400	270	250	120
20	410	410	410	400	400	350	180	140	130	110

Table 2，3 によれば，細菌の繁殖を完全に抑制する過酸化水素の濃度は 1/5000 以上であるが，培地のゼリー強度の変化から見た場合，濃度 1/8000〜1/10000 では 15 日間，1/13000〜1/20000 では 10 日間，大したゼリー強度の低下は認められないので，実際製造の場合にも 2 の実験と同様の条件であれば，過酸化水素はかなり有効であると思われる。また実験条件が異るため厳密に言えば比較することは適当でないかも知れないが，本実験の結果から過酸化水素は植田[2] の観察結果と同等或はそれ以上に "ダンカン" に関与する細菌に対し繁殖抑制の効力を有するものと思われる。

なお細菌の繁殖が完全に抑制された濃度 1/5000 以上の場合にも，同一培地についてゼリー強度 20〜110 g/cm^2 の減少が見られるが，これは主として測定温度（7.5〜14.7°C）の影響であると思われる。また日数の経過に伴つて培地のゼリー強度はやゝ低下する傾向が見られる。さらに過酸化水素を添加すると直ちにトコロテン培地のゼリー強度を低下させる傾向が認められる。これについては後日報告したい。

（2） 次亜塩素酸ソーダの効力

次亜塩素酸ソーダは有効塩素量 6.7 %のものを用い，トコロテンに対し有効塩素量 1/10000〜1/50000 の割合になるように添加し，それぞれ混菌の濃厚懸濁液を分注し，室温（4〜20°C）に放置して細菌の繁殖抑制の状態を観察した。

Table 4，5 に見られるように，細菌の繁殖を完全に抑制する次亜塩素酸ソーダの濃度は 1/10000 であるが，ゼリー強度の変化からは濃度 1/20000 以上で 20 日間，1/40000 で 15 日間，1/50000 で 10 日間，大したゼリー強度の低下が認められないので，次亜塩素酸ソーダは植田[2] の観察結果よりもはるかに "ダンカン" に関与する細菌に対し繁殖抑制の効力を有するものと思われる。

Table 4. Bacteriostatic effect of sodium hypochlorite on the mixed culture

Concentration \ Time in days	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1/10000	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1/20000	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	±	+	+	+
1/40000	−	−	−	−	−	−	−	−	±	±	±	+	+	+	+	+	++	++	+++	+++
1/50000	−	−	−	−	±	+	+	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	+++
Control	−	−	−	±	++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Incubation temperature, 4～20°C.

Table 5. Effect of sodium hypochlorite on the jelly strength of "tokoroten" inoculated with the mixed culture

Time in days \ Concentration	1/10000	1/20000	1/40000	1/50000	Control
0	570	580	600	600	600
5	550	560	580	590	380
8	580	570	580	590	200
11	630	630	640	400	150
14	590	580	580	350	120
17	550	530	380	160	110
20	500	510	330	120	100

（3） B.A.C. の効力

B.A.C. は濃度 10 %のものを用い，トコロテンに対する割合が純濃度として 1/5000～1/50000 になるように添加し，それぞれ混菌の濃厚懸濁液を分注し，室温（4～20°C）に放置して細菌の繁殖抑制の状態を観察した。

Table 6，7 に見られるように，濃度 1/20000～1/5000 で 5～7 日間細菌の繁殖を抑制し，ゼリー強度の変化からは濃度 1/5000 で 20 日間，1/10000～1/20000 で 14 日間，大してゼリー強度の低下が認められなかつた。

Table 6. Bacteriostatic effect of B.A.C. on the mixed culture

Concentration \ Time in days	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1/ 5000	−	−	−	−	−	−	−	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10000	−	−	−	−	−	±	±	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++
1/20000	−	−	−	−	−	±	±	+	+	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
1/50000	−	−	−	−	±	±	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++
Control	−	−	−	±	++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Incubation temperature, 4～20°C.

（4） C.T.C. 及び T.C. の効力

C.T.C. 及び T.C. は純度 99 %以上のものを用い，トコロテンに対し濃度 1/100000～1/500000 の割合に添加し，それぞれ混菌の濃厚懸濁液を分注し，室温（4～20°C）に放置して細菌の繁殖抑制の状態を観察した。

Table 7. Effect of B.A.C. on the jelly strength of "tokoroten" inoculated with the mixed culture.

Time in days \ Concentration	1/5000	1/10000	1/20000	1/50000	Control
0	640	620	650	650	600
5	620	600	600	550	380
8	590	570	570	450	200
11	650	620	520	320	150
14	630	520	530	170	120
17	570	230	220	110	110
20	550	100	100	100	100

Table 8. Bacteriostatic effects of C.T.C. and T.C. on the mixed culture.

Concentration \ Time in days	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
C.T.C.																				
1/100000	−	−	−	−	−	−	−	±	+	+	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
1/200000	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
1/500000	−	−	−	−	−	−	±	+	++	++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
T.C.																				
1/100000	−	−	−	−	−	−	−	±	+	+	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
1/200000	−	−	−	−	−	−	−	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
1/500000	−	−	−	−	−	±	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Control	−	−	−	±	++	++++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Incubation temperature. 4～20°C.

Table 9. Effects of C.T.C. and T.C. on the jelly strength of "tokoroten" inoculated with the mixed culture

Antiseptics	C. T. C.			T. C.			Control
Time in days \ Concentration	1/100000	1/200000	1/500000	1/100000	1/200000	1/500000	
0	610	620	620	620	620	620	600
5	600	600	600	600	600	600	380
8	570	580	550	580	420	350	200
11	660	670	350	640	350	180	150
14	570	320	220	560	250	180	120
17	220	110	110	220	120	110	110
20	120	110	110	140	120	110	100

Table 8, 9 に見られるように，C.T.C.，T.C. ともに濃度 1/100000～1/200000 では 7 日間細菌の繁殖を抑制した。またゼリー強度の変化から見た場合，C.T.C. は濃度 1/100000 で 14 日間，1/200000 では 11 日間，1/500000 では 8 日間，大してゼリー強度の低下が示されず，T.C. は 1/100000 では 14 日間，1/200000～1/500000 では 5 日間，大してゼリー強度の低下が認められなかつた。従つて C.T.C. の方が T.C. よりも効力があるように思われる。

要　約

"ダンカン" に関与する細菌に対する数種防腐剤の繁殖抑制効力について実験し，次の結果を得た。

1. 寒天の製造工程中 "ダンカン" 状態を呈したトコロテン及び寒天並びに赤褐色に汚染された寒天製造

用ヨシ簀の藁縄から分離した寒天分解細菌に対しては，B.A.C.，過酸化水素，次亜塩素酸ソーダ等がいずれも濃度 1/10000 で著しい繁殖抑制効力を示し，C.T.C.，T.C. も濃度 1/100000 でかなりの効力を示した。D.H.A.，ソルビン酸，Z.F.，過酸化ソーダ等は濃度 1/10000 で殆んど効力を示さなかつた。

2. “ダンカン”の原因となる寒天分解細菌及び数種の色素産生細菌の混合培養に対しては，次亜塩素酸ソーダ，過酸化水素が著しい繁殖抑制効力を示し，B.A.C.，C.T.C.，T.C. もかなりの効力を示した。

文献

1) 芝崎 勲：未発表，(1954).

2) 植田正勝：寒天の製造工程における腐敗及びその対策について，13～20 (1955).

3) 石松一雄・木部崎雄三：科学と工業，**29**，279～282 (1955).

4) 藤沢浩明・助川輝武：本誌，**22**，30～34 (1956).

5) 藤沢浩明・助川輝武：本誌，**23**，306～314 (1957).

キリンサイ *Eucheuma muricatum* (GMEL.) WEBER VAN BOSSE 粘質物に関する研究—IV. イオン交換樹脂による酸性中性両糖の分離とその濾紙クロマトグラフ

中村 武彦
(宮崎大学農学部)

Studies on Mucilage from the Seaweed, *Eucheuma muricatum* (GMEL.) WEBER VAN BOSSE—IV. Separation of Acidic and Neutral Sugars by Ion Exchange Resins and their Identification by Paper Chromatography.

Takehiko NAKAMURA

In the previous paper[1)], the paper chromatographic detection of three component sugars, galactose, glucurone and anhydrosugar was reported on the acid hydrolysates of *Eucheuma* mucilage.

Further trials to confirm the component sugar of the mucilage were carried out, by dividing the hydrolysates with ion-exchangers (Amberlite IRA—400 and IR—120) into acidic and neutral sugar fractions (Fig. 2), which were subjected to paper chromatography (Fig. 3 and 4). The effect of several factors on the Rf value of sugars was also examined preliminarily, as shown in Fig. 1 and the value was found to be influenced by the aging of a solvent (n-BuOH : AcOH : H_2O 4 : 1 : 2), sugar concentration and the presence of Ba-salts.

Together with *Eucheuma* mucilage, agar-agar and the mucilage of *Gloiopeltis furcata* ("Sheet Funori") were studied in the same manner for comparison (Fig. 5).

The neutral fraction of hydrolysates of *Eucheuma* mucilage gave three spots of galactose, anhydrosugar, and also xylose. The acidic fraction, on the other hand, gave only distinct spots, which seemed to be galactose sulfate. Glucuronic acid or its lactone was not detectable in this way. The chromatograms of agar-agar and *Gloiopeltis* mucilage were very similar to that of *Eucheuma* mucilage except the absence of L-fucose in the latter.

From the fractionation products of *Eucheuma* mucilage and agar-agar with methanol and methanol-ether. the anhydrosugar was isolated as phenylosazone (m.p. 208—210°C) and considered to be anhydro-L-galactose.

緒 言

前報[1)]に於て，著者は一次元濾紙クロマトグラフによりキリンサイ粘質物の Ba 塩はガラクトーズ，アンヒドロ糖及びグルクロンの3成分より成ることを報告した。しかし後の2者は推測の域を脱していないのでその後これを確認すべく追求した。そこでまず酸性及び中性両糖を分離する目的でイオン交換樹脂を使用した。ついでそのおのおのについて前報と同様に濾紙クロマトを実施し構成糖について検討したところ前とは多少異つた結果が得られたのでその結果を報告する。なお上記両糖の確認ならびに構成糖間の量的関係は続報で報告する予定である。

実験及び成績

1. 糖の濾紙クロマト法の検討

a) 展開液の新旧，糖液の濃度及び Ba 塩の存否による Rf 値の変動

1957 年 9 月 3 日 受理
本研究の概要は昭和 31 年度日本水産学会秋期大会（広島市）で発表した。

展開液は n-BuOH : AcOH : H_2O (4 : 1 : 2) を用いた。しかしこのものは糖相互の分離には比較的良い結果を与えるが，古くなるとエステル化するため Rf 値が変り易い。EDINGTON など[2]は室温で 14 日間放置したものか又は使用前還流冷却器をつけて 1 時間沸騰させたものを使うことを推奨している。著者はキリンサイ粘質物水解液の濾紙クロマトを行うにあたつて，水解液の中和に $Ba(OH)_2$ 及び $BaCO_3$ を併用しているがその中和濾液には Ba が検出される。故に Rf 値の変動には Ba 塩の存否も影響するのではないかと考え，同時に展開液の新旧，糖液の濃度差による Rf 値の変動を知るため種々の濃度の純グルコーズ溶液について調べた。その結果は Fig. 1 に示す通りである。

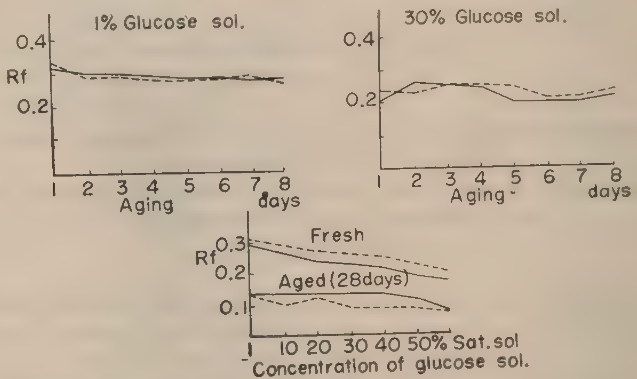


Fig. 1. Variation of Rf value due to aging of solvent, concentration of sugar solution and the presence of Ba-salts.

Note : Full line : Glucose only.
Broken line : Glucose solution saturated with $BaCO_3$ and $BaSO_4$.

Fig. 1 を通して見られるように，糖液の濃度が高い程 Rf 値は低い。また Fig. 1 の 3 に示されるように非常に古い展開液を使用する場合は新らしい場合より Rf 値が低くなり，殊に Ba-塩を含む場合に著しい。

なお $BaCO_3$ と $BaSO_4$ の糖液中の溶解度は純水の場合より著しく，純水の場合極めて微量のため正確な測定が出来なかつたが，1 %グルコーズ溶液では 48 mg/100 ml (Ba として) となり，10, 20, 30, 40 及び 50%グルコーズ溶液ではそれぞれ 48, 51, 54, 63, 81 mg/ml となることを観察した。(飽和温度 20°C)。

著者の経験によれば一定組成の展開液を使用した場合は Rf 値の変動はあつてもスポット相互の位置は不変である。よつて粘質物水解液の濾紙クロマトによる各スポットの同定には予め試料に目標とする標品を添加したものとしないものとを同時に展開し，両者を比較することによつてなすこととした。

b) ガラクトーズ，キシローズ及びグルクロンの発色限界濃度

キリンサイ粘質物中のグルクロンは存在するとしても，ガラクトーズ，アンヒドロ糖に比して極めて含量が少ないと思われるが，クロマトグラム上には明瞭なスポットをつくらない。スポットの発色は使用する発色剤によつて色調は勿論その鋭敏度を異にするが，発色剤としてアニレジン塩酸塩のブタノール溶液を用いたときの鋭敏度を知るため，ガラクトーズ，キシローズ及びグルクロンについてその発色限界濃度をしらべて見たところ次のようであつた。

ガラクトーズ　25 mg %,　キシローズ　25 mg %,

グルクロン　210 mg %

(スポットの点滴は 1 回でその大さは径約 3 mm)

即ちグルクロンは他の 2 者に比し発色限界濃度が非常に高い。即ちそれだけ発色し難いことを知つた。

2. イオン交換樹脂による酸性糖の分離法

イオン交換樹脂による糖の分離については 2, 3 の文献[3]があるが，著者は橋本[4]が貝類の杆晶体で行つた方法にほゞ準拠して行つた。即ちキリンサイ粘質物の Ba 塩 1 g を稀硫酸で加水分解後 $Ba(OH)_2$ と $BaCO_3$ とを以て中和し，その濾液を適当に真空濃縮 (40° 以下) せる糖液についてイオン交換樹脂処理を

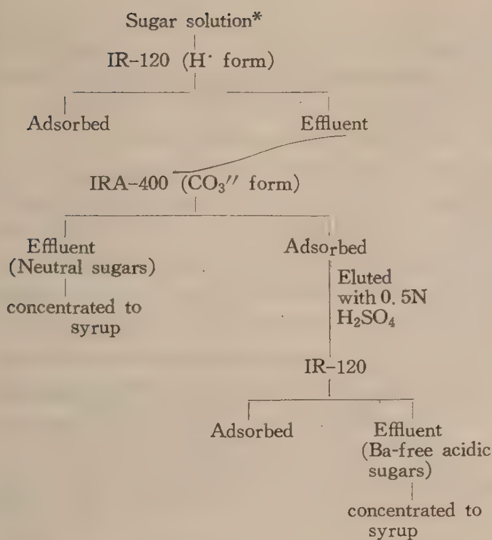


Fig. 2. Fractionation of sugar solution by ion-exchangers.

* The sugar solution was preliminary heated with $BaCO_3$ for 20 minutes to open the lactone ring of glucurone.

行つた。その方法の概要は Fig. 2 に示す如くである。

本法では Ba イオン除去のため IR—120 を IRA—400 処理の前後に使用しているが，果して Ba イオン除去が糖の分離上効果があるかどうかを知るため，キリンサイ粘質物に応用するに先だつてガラクトーズ，キシローズ及びグルクロン混合液について（1）本法の通りに行つた場合，（2）最初の処理のみ行つて最後の処理を省略した場合，（3）全く（2）の逆の場合，（4）IR—120 処理を全く行わない場合について実験したところ，中性糖の分離は IR—120 処理に無関係に完全に分離可能であることを知つたが，酸性糖の方はかなり異つた結果が得られた。即ち（1），（3）処理ではグルクロン（Rf 0.37—0.41）及びその遊離酸（Rf 0.14—0.18）の両者が得られ，スポットの輪廓は（1）の場合が最も明瞭で，（3）の場合のグルクロンはやゝ薄かつた。又（2）では遊離酸のみ検出され（4）からはその Ba 塩（Rf 0.10—0.11）のみが検出された。故にグルクロン及びその遊離酸を検出するにあたつて最初の IR—120 処理は不必要であるが，この処理を省いた場合には中性糖に Ba 塩が含まれるのでこれを避けるため IR—120 前処理を行つた。

3. 粘質物の水解度による糖成分の変化

キリンキイ粘質物の構成糖を深く研究するため，水解剤たる硫酸の濃度及び水解時間を種々変えて水解した後，前項2で述べた方法で中性及び酸性両糖を分離した後，各々について濾紙クロマトを実施し，比較検討した。なお供試濃縮糖液の濃度差はできるだけ少ないよう留意した。結果は Fig. 3 の通りである。

この結果から認められるように，（1）2次的水解物と思われるものはない。（2）中性糖にはガラクトーズ，アンヒドロ糖以外にキシローズが存在する。このスポットと原液のキシローズ部のスポットの形状には多少の違いが見られた。即ち前者が明瞭な輪郭を持つた桜色であるに反し後者はやゝテーリングの傾向のあるほゞ同色のスポットであつた。（3）酸性糖区分には Rf 0.1 以下のところに恐らくガラクトーズの硫酸エステルと推定される黄褐色のスポットが得られるがグルクロンのスポットは明らかに現われなかつた。（4）アンヒドロ糖の Rf は上昇度の低い糖の Rf が前に述べたような変

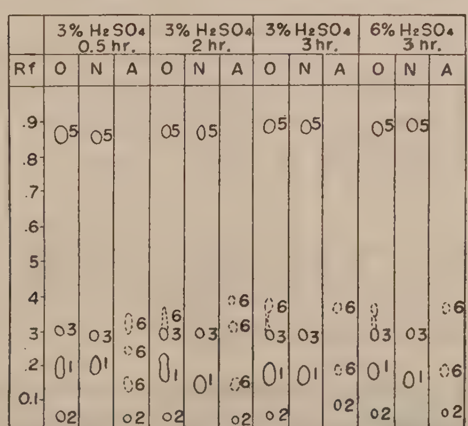


Fig. 3. Paper chromatogram of the hydrolysates obtained from Ba-salt of *Eucheuma* mucilage under different hydrolytic conditions.

Note :
O : Hydrolysates before separation
N : Neutral sugar fraction
A : Acidic sugar fraction
Spot 1: Galactose (yellowish brown)
〃 2: Galactose sulphate (yellowish brown)
〃 3: Xylose (cherry red)
〃 4: Fucose (orange brown)
〃 5: Anhydrosugar (bright yellow)
〃 6 (closed with broken line): Indistinct spot

動原因によつて低くなると逆に高くなる傾向をみた。

4. 寒天及びすきふのりとの比較

キリンサイ原藻 50 g から粘質物を常法により冷浸し，市販寒天及びすきふのりは水と加温してそれぞれの膠質液を調製し，これらの粘質物に硫酸を加えて約 6 %濃度となしたるのち，湯浴中で 6 時間糖化し冷却後 $Ba(OH)_2$ と $BaCO_3$ で中和し，濾液を骨炭で 2 回脱色し，40° 以下で真空濃縮し黄金色シラップとなしこのうち 1/3 量を前記同様にイオン交換樹脂処理に供した。結果は Fig. 4 の如くである。

即ち 3 紅藻粘質物の成分はよく似ていて主成分は何れもガラクトーズ，アンヒドロ糖及びキシローズであるが，寒天とすきふのりではキリンサイに見られないフコーズが中性糖区分に認められる。フコーズの Rf はグルクロンの Rf とよく似ているが，フコーズは酸性糖区分に認められないで中性糖区分に認められることと発色が赤味を帯びていないことでグルクロンと区別可能である。酸性糖区分にはガラクトーズの硫酸エステルと思われるスポットは常に見出されるが，グルクロン又はグルクロン酸に相等するものはやはり明らかに現われなかつた。

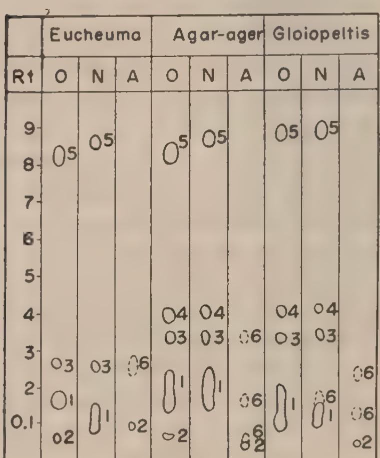


Fig. 4. Paper chromatogram of the hydrolysates obtained from mucilages of *Eucheuma muriactum*, *Gloiopeltis furcata* and agar-agar.
Note : Signs for each sugar are same as Fig. 3.

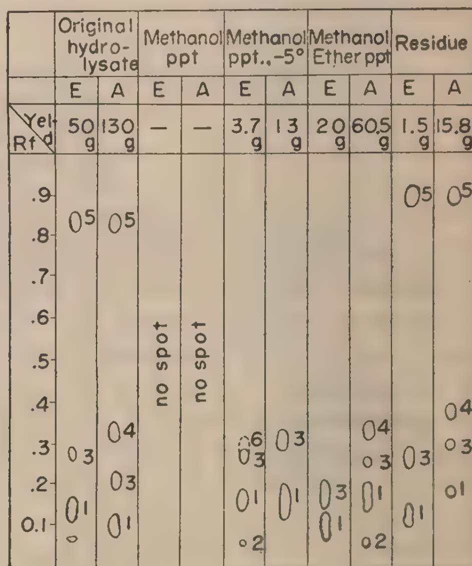


Fig. 5. Paper chromatogram of the fractionation products of hydrolysates obtaine from *Eucheuma* mucilage and agar-agar
Note : Signs for each sugar are same as Fig. 3
E : *Eucheuma* mucilage
A : Agar-agar

5. キリンサイ，市販寒天水解物よりメタノールによる各成分の分別

証明が困難であるグルクロンとアンヒドロ糖とを分離する目的で，両粘質物水解物より（6 % H_2SO_4，6 時間湯浴中で水解）メタノール沈澱法で分別してみた。寒天については既に荒木[5] の詳細な報告がある。本実験では，まず常温でメタノールを加えて得られる沈澱物（A）を分取後母液に再びメタノールを加えて −5° に放置して得られる沈澱（B），これを分取後更にメタノール，エーテル混合溶剤から沈澱する区分（C），最後にその非沈澱区分（D）の 4 区分に分ち，それぞれの区分について濾紙クロマトを行つた結果は Fig. 5 に示す通りであつた。

（A）区分は両粘質物とも着色度が極めて濃いので温水再溶解とメタノール沈澱とを交互に繰返し精製すると $BaSO_4$ を分離してくる。最後に骨炭処理すれば淡色となるもメタノールで全く沈澱しなくなつた。（B）（C）区分からは多量のガラクトーズの結晶を得るが，濾紙クロマトでみるとなお不純であつた。肝心のグルクロンは得られなかつた。（D）は非晶質で，濾紙クロマトでアンヒドロ糖を主成分とすることを知る。

又強く SELIWANOFF 反応を与えた。さらにフェニールオサゾンをつくるに精製はかなり困難であるが美麗な黄色針状結晶を得た。その融点は 208—210° で文献記載[6] のアンヒドロ-L—ガラクトーズのそれに比しやゝ低いが恐らく（D）区分の主成分はこのものであろうと推定された。

要　　約

（1） 水解条件を種々変えてキリンサイ粘質物 Ba 塩を加水分解したのち，イオン交換樹脂を用いて中性及び酸性糖の両者に区別し，両区分の濾紙クロマト結果から，中性糖としてガラクトーズ，アンヒドロガラクトーズ及びキシローズをほゞ確実に同定することができた。また酸性糖区分からはガラクトーズの硫酸エステルと思われるものが存在することをみたがグルクロンの存在は明らかでなかつた。

（2） ブタノール，醋酸，水（4：1：2）を展開液として使用する場合は Rf 値が糖濃度及び展開液の新旧，糖液中の塩類で影響をうけることを純グルコーズ溶液を用いて示した。

（3） キリンサイ粘質物，市販寒天及びすきふのりの直接硫酸加水分解物について前と同様にイオン交換樹脂で分離を行い，ついで濾紙クロマト法で成分を比較したところ，寒天，すきふのりには前記以外の成分としてフコーズの存在を知つた。

（4） キリンサイ粘質物及寒天の直接硫酸加水分解液にメタノール，ついでメタノールエーテル混液を加えることによつて 4 つの区分に分別し，各区分について濾紙クロマトグラフを行つたところ，グルクロンは結局得ることができなかつたが，アンヒドロ糖区分はそのフェニールオサゾンからほゞ確実にアンヒドロ-L—ガラクトーズであることを知つた。

本報を終るにあたり始終御懇篤なる御指導をいたゞいた東京大学教授森高次郎先生に感謝するとともに，イオン交換樹脂による分離法，糖の濾紙クロマト法の検討，或は標品の御恵与など多大の御援助と御教示を賜つた同助教授橋本芳郎氏並に大学院学生岡市友利氏に対し深甚の謝意を表する次第である。

文　　献

1) 中村武彦：日水会誌，**21**，1057（1956）.
2) R. A. EDIMGTON and E. PERCIVAL：*J. Chem. Soc.*（1955）3554.
3) 本田雅健：“イオン交換樹脂” 1 版，広川書店，東京，（1955），p. 232—244.
4) Y. HASHIMOTO：日水会誌 **21**，352（1955）.
5) 荒木長次：日化誌 **58**，1214（1937）.
6) 荒木長次：日化誌 **61**，775（1940）.

キリンサイ *Eucheuma muricatum* (GMEL.) WEBER VAN BOSSE 粘質物に関する研究—V. グルクロン酸の確認

中 村 武 彦
(宮崎大学農学部)

Studies on Mucilage from the Seaweed, *Eucheuma muricatum* (GMEL.) WEBER VAN BOSSE—V. Identification of Glucuronic Acid

Takehiko NAKAMURA

Glucuronic acid or its lactone (glucurone) is nowadays recognized as one of the sugar components of mucilages from seaweed.(1),(2) The detection of glucurone by paper chromatography was very difficult as reported in the previous paper.(3) In the present paper, several color reactions for glucuronic acid were applied to the acidic fraction separated with ion-exchangers from the hydrolysates of Ba-salt of the mucilage. The following results were obtained:

(1) The most reliable and sensitive test was found to be the WILLIAMS reaction.(5) The color formed showed a characteristic absorption maximum at 600mμ. (Fig. 2).

(2) DISCHE's thioglycolic acid(6) and cysteine reactions(7) were also useful for detection, but not for determination, because the color intensity was markedly affected by the conditions in treating with conc. H_2SO_4 (Fig. 3, 4).

(3) The original naphthoresorcinol reaction (TOLLENS)(4) gave a characteristic absorption curve which has a maximum peak at 559mμ, but it was less sensitive than the WILLIAMS reaction. This reaction seems to be inapplicable for the determination, because the extraction of the color substance was not quauntitative. (Fig. 1).

(4) The JARRIGE's reaction(5) seemed to be inadequate for spectrophotometric investigation due to the formation of turbid coloration.

(5) The carbazol reaction(8) was found to be not specific for glucuronic acid and the similar absorption curves were obtained on xylose, glucose and galactose (Fig. 5).

Thus, glucuronic acid or glucurone in the acidic fraction of *Eucheuma muricatum* was clearly identified by the WILLIAMS, DISCHE's and original naphthoresorcinol reactions, and its content was 3.27 % on the dry basis of the hydrolysates, when determined by the WILLIAMS reaction.

緒　言

紅藻粘質物中のグルクロン酸又はそのラクトン即ちグルクロンの存在に関しては，荒木(1)が寒天質中にその存在を確め，最近勝浦等(2)は高周波滴定法を応用して各種の紅藻粘質物中の硫酸基とカルボキシル基との組成比とゼリー形成能との関係を研究している。著者は前報(3)に於てイオン交換樹脂を用いて粘質物水解液から酸性糖を分ち，この区分中の成分を濾紙クロマト法で調べたがグルクロン酸又はグルクロンの存在は明らかでなかつた。これらの酸性糖が濾紙クロマト法で検出困難な原因は，アニシジン塩酸塩などの発色剤に対し他のガラクトーズ或はキシローズに較べて鋭敏でないことによることも一応考えられるが，他に何等かの原因があるかも知れない。酸性糖区分には硫酸エステルが認められるので，グルクロン酸がもし存在すればこの区分に出てくる筈であるのでこの区分について種々のグルクロン酸確認反応を試みた。その結果このものの存在がほゞ確められたのでここに報告する。

1957 年9月3日受理

実験及び成績

ウロン酸の微量検出法の主なものとしては次のようなものがある。即ち (1) Naphthoresorcinol 反応[4] (TOLLENS), (2) JARRIGE の反応[5], (3) WILLIAMS の反応[5], (4) DISCHE の Thioglycolic acid[6] 及び Cysteine 反応[7], (5) Carbazol 反応[8], 以上の6種の反応について，数種の糖標品を用いて（糖濃度は各図参照）比較検討するとともに，キリンサイ粘質物の水解中和液からイオン交換樹脂で分離した酸性糖区分（濃度は図参照。但し WILLIAMS 及び Thioglycolic acid 両反応の分は WILLIAMS 法で，他は WILLSTÄTTER SCHUDEL 法でグルクロンとして測定せる定量値である）及び寒天，フノリ粘質物からの酸性糖区分或は帯状に展開した濾紙クロマトからキシローズ部（グルクロンが混在すると考えられる区分）を切取つて温浸した区分（Ep, Fig. 4）等についても多少研究した。（濃度は何れも WILLSTÄTTER SCHUDEL 法で測定)。

(1) Naphthoresorcinol 反応　試料を同容の濃塩酸で酸性にしたのち Naphthoresorcinol 約0.1gを加え約1分間煮沸し，50°C附近に冷却し，ここに生成せる色素を Benzol を以て抽出しその色調から検出する方法である。グルクロンではこの際美しい紫色を帯びるが，他の糖では赤紫色を呈する。しかし色調による判定は極めて困難を感じる。Benzol 液の吸収曲線を求めると Fig. 1 の如くで，グルクロンは 559 mμ に最大吸収を有する山形曲線をえがき他の糖と明らかに区別出来た。しかし，この反応では反応生成物を完全に Benzol 層に移行せしめることは困難で且不完全である。又移行した色調は長くおくと変色するので定量に供することは困難であつた。キリンサイ,寒天から分離した酸性糖部の吸収曲線はグルクロンのそれにあまりよくは似ていないが 559 mμ に小さいピークが認められた。

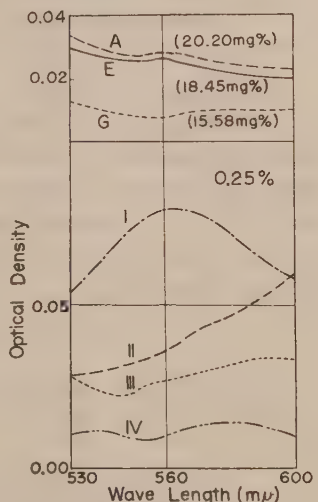


Fig. 1. Naphthoresorcinol reaction
Authentic specimen : I : glucurone, II : galactose, III : glucose, IV : xylose. Acidic sugar fraction : E : *Eucheuma muricatum*, A : agar-agar, G : Xylose fraction of *Gloiopeltis furcata* separated from paper chromatogram.

(2) JARRIGE の反応　試料に Naphthoresorcinol と濃硫酸を加え，かつ加熱して反応せしめるのであつて，純グルクロンの場合は紺色を呈し，キシローズは帯赤紫色となり，ガラクトーズでは灰白色で色素を殆ど生成しない。故に色調で区別出来ないことはない筈であるが，いずれも沈澱を生じる。これを濾過すると濾液は無色となる。故に吸光度の測定は不可能であつた。

(3) WILLIAMS の反応　試料に Naphthoresorcinol と濃塩酸とを加え湯浴中2時間処理して生ずる反応生成物を Amylalcohol で抽出し，この層に更に Ethanol を加えて色調を濃厚ならしめたのち吸光度を測定する方法である。本法では，TOLLENSの Naphthoresorcinol 反応における Benzol 抽出の場合とちがつて直ちにかつ完全に色素が Amylalcohol に移行する。色は透過光線で観察するとグルクロンでは鮮青色を呈し且強い緑色螢光を有す。キシローズでは緑色螢光を帯びた緑色で多少グルクロンの場合と異る。ガラクトーズではこの反応によつてやはりキシローズとほゞ同一色調のものを得るが同じ濃度からのものを比較するとキシローズよりも淡い。次に Amylalcohol 層を分取して，これに Ethanol を加えると何れの糖もその色の濃さと緑色螢光を増しほゞ同一色調となるが，各糖濃度を同じくした場合を比較すると色の濃さは区別出来る。即ちグルクロンの場合は最も濃くガラクトーズ最も薄い。本反応は極めて鋭敏でグルクロンでは $2.1^{mg}/_{100ml}$ の如き低濃度でも比較的安定でかつ吸光度の測定が可能であつた。標品とキリンサイの酸性糖区分について測定した結果は Fig. 2 の通りである。

即ちグルクロンでは 600mμ に最大吸収を有する山形曲線をえがき，キシローズの場合と趣きを異にする。ガラクトーズでは盲検の吸光度より小さいため負の吸光度を示した。又キリンサイから分離した酸性糖区分の吸収曲線は殆ど全くグルクロンのそれに一致した。本反応はまた濃度と吸光度（600mμ に於ける）との間

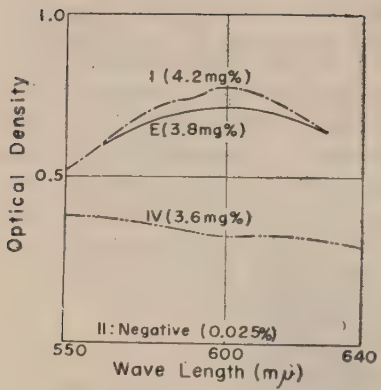


Fig 2. Williams reaction

Ⅰ: glucurone, Ⅱ: galactose
Ⅳ: xylose, E: *Eucheuma*

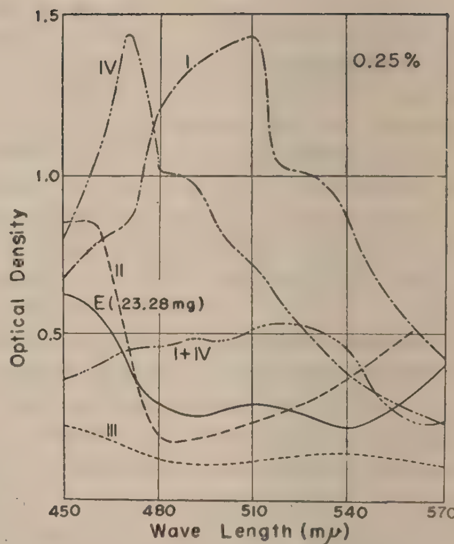


Fig 3. Dische's thioglycolic acid reaction

Ⅰ: glucurone, Ⅱ: galactose
Ⅲ: glucose, Ⅳ: xylose,
E: *Eucheuma*

にほゞ直線的関係が認められるので定量にも応用できることを知つた。詳細は続報にゆずるが，キリンサイ粘質物からの酸性糖区分中に，その水解中和原液中の乾物に対し 3.27% を検出できた。

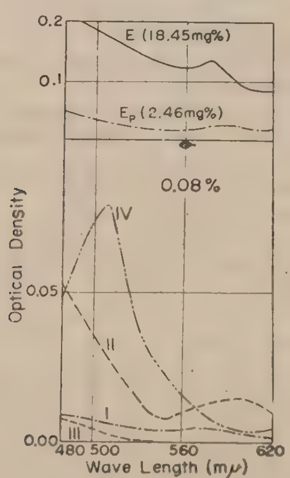


Fig. 4. Dische's cysteine reaction

Ⅳ: glucurone, Ⅱ: galactose,
Ⅲ: glucose, Ⅲ: xylose,
E: *Eucheuma*, Ep: xylose fraction of *Eucheuma*

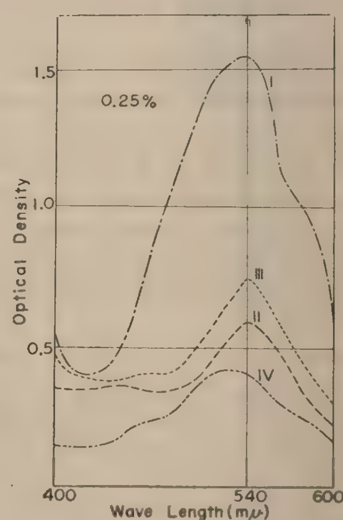


Fig. 5. Carbazol reaction

Ⅰ: glucurone, Ⅱ: galactose,
Ⅲ: glucose, Ⅳ: xylose

(4) Dische の **Thioglycolic acid** 反応

マンノーズの存在のもとに濃硫酸処理後 Thioglycolic acid

を加え，生成する色（グルクロン：ピンク，キシローズ：黄色を帯びたピンク，グルコーズ：やゝ淡いピンク，ガラクトーズ：緑色，酸性糖区分：黄緑色）の吸収曲線から検出する方法である。本法については既に第Ⅲ報[9]に於て一部を発表したが，その後更に追試した結果は Fig. 3 に示す如くである。即ち純グルクロン及びキシローズは何れも山形曲線をえがくが最大吸収波長を異にし，前者は 510 mμ にあるが，後者は 470mμ に認められた。ガラクトーズ，グルコーズなどは特異性のある曲線をえがかない。又酸性糖区分は他の糖の影響を受けるためかグルクロンの曲線とかなりちがつているが 510mμ に弱いピークを持つていた。

なお本法は生成する色調はほゞ一定であるが濃硫酸処理のため濃さの調整がむずかしいので定量には不向きであると考える。

(5) Dische の Cysteine 反応　本法は元来ガラクチュロン酸検出反応である。濃硫酸処理後 Cysteine を加えて生成する色の吸収曲線から検定する方法である。その一部は既に報告[10]したが更に追試をしたのでその結果を示す。即ち Fig. 4 の如くである。即ちグルクロン及びグルコーズは特異の曲線を示さない。吸光度も極めて弱い。然るにキシローズは 510mμ に最大吸収を有する山形曲線をえがいている。ガラクトーズは 600mμ 附近に小さいピークを持つているが波長の増大ととも減少する曲線をえがく。キリンサイ粘質物水解中和原液からの酸性糖区分及び原液の濾紙クロマト（帯状展開）から得られたキシローズ，グルロン混合区分の温浸液即ちいわゆるキシローズ部は何れも特異の曲線をえがかなかつた。

(6) Carbazol 反応　濃硫酸溶液に試料を加え（氷水中で）次に Corbazol の Alcohol 溶液を加えて発色せしめこれを比色する方法であるが，その吸収曲線は **Fig.** 5 に示す如くである。色は濃淡はあるが何れも赤紫色を呈する。即ち何れも 540mμ 附近に最大吸収を有する山形曲線で，同一濃度ではグルクロンの吸光度が最も大きく，グルコーズ，ガラクトーズ，キシローズの順に小さい。しかし糖混合液から本法によるグルクロンの同定は不可能と考えられる。

要　　約

キリンサイ粘質物の Ba 塩の硫酸水解液から得られた糖原液中の酸性糖区分をイオン交換樹脂を用いて分離し，この区分中のグルクロン又はその遊離酸を確認するため，グルクロン酸呈色反応の主なものについて純品と比較しながら検討した。結果は次の如くであつた。

（1） 糖混合液からグルクロンの微量検出及び定量に最も有効な反応は Williams の反応であつた。この反応を応用してキリンサイ粘質物からの酸性糖区分にはグルクロン又はその遊離酸が存在しその量は水解中和原液中の乾物に対し 3.27% という結果を得た。

（2） Dische の Thioglycolic acid 反応も亦グルクロンの検出に有効であつたが，濃硫酸処理をするためあらわれる色調に変動を生じやすいので定量には不向きであつた。Cysteine 反応は明らかに陰性であつた。

（3） Tollens の Naphthoresorcinol 反応は Benzol 抽出が困難でかつ完全に行われないので定量には不向きであるがグルクロンの吸収曲線は 559mμ に最大吸収を有する特異曲線をえがくので，このことからグルクロンの検出は可能であるが鋭敏度は Williams 反応より劣る。

（4） Jarrige の反応は反応生成物が溷濁するので吸光度の測定ができなかつた。

（5） Carbazol 反応は同一濃度でその吸光度に差はあるが，何れの糖も同一曲線をえがくので混合糖液からのグルクロン検出は困難と思われる。

結局，Williams，Dische，及び Tollens の Naphthoresorcinol 反応から，キリンサイ粘質物中にグルクロン（又はグルクロン酸）が少量存在することを確認することを得た。

文　　献

1） 荒木長次： 日化誌，**58**，1214（1937）.
2） 勝浦嘉久次，鈴木昭三郎： 工化誌，**59**，1067（1956）.
3） 中村武彦： 日水会誌 **23**，647（1958）.
4） 東京大学： "実験農芸化学" 下巻，初版，朝倉書店，東京（1932），p. 393.
5） 赤堀四郎： "酵素研究法" 第Ⅲ巻，初版，朝倉書店，東京（1957）p. 658.
6） Z. Dische： *J. Biol. Chem.*，**171**，725（1947）.
7） Z. Dische： *Arch. Biochem.*，**16**，409（1948）.
8） G. Gurin aud D. B. Hood： *J. Biol Chem.*，**131**，211（1939）.
9） 中村武彦： 日水会誌 **21**，1057（1956）.

水産動物組織の酵素分解に関する研究—III.
アンモニア生成とアミドとの関係

柏　田　研　一
（鹿児島大学水産学部）

Studies on the Enzymatic Degradation of Aquatic Animal Tissues—III.
Relations between Ammonia Generation and Amide

Ken-ichi KASHIWADA

The present paper deals with the generation of ammonia through the enzymatic degradation of aquatic animal tissue. The results obtained may be summarized as follows :

1. In cases that pyloric coeca extract was added to the fish muscle, the amount of ammonia generated was estimated to be equivalent to the amount of amide nitrogen reduced in the substrate. Hence the generated ammonia may de supposed to have been derived from the amide nitrogen in the muscle.

2. While, in the autolysis of pyloric coeca, the amount of ammonia generated was far more abundant than that of amide nitrogen reduced : from this phenomenon, the generation of ammonia by an unknown substance besides amide was suggested.

3. Under the enzymatic degradation of fish muscle, the optimum pH for ammonia generation ranged from 5 to 6 ; in case of autolysis of pyloric coeca it was fixed to be 9 or more than that.

魚肉が自己分解する場合生成するアンモニアは一般に極めて微量であり，死後産物としてのアンモニアは主として細菌に由来するところからアンモニア量は肉の鮮度判定上有力な基準となつている。然るに著者の実験[1) 2)]によると，幽門垂酵素又はプロテアーゼを魚肉に作用せしめると可成り多量のアンモニア生成が見られ，牛肉や鯨肉ではその生成量が少く又魚肉でも種類によつて差のあることが知られた。而して上記可成り多量のアンモニアというのは，従来考えられている腐敗の限界 30 mg % を遥かに突破する量であるが，このように多量のアンモニアが腐敗生産物としてでなく発生するということは興味ある現象と思われるのでこの場合のアンモニア生成機構について実験を進めて来たところ，アンモニアは一部アミド態窒素に由来していることが推定されるに至つたのでその結果を報告する。

実　験　の　部

実験 1.　魚肉に幽門垂酵素を作用せしめる場合に於けるアンモニア態及びアミド態窒素の変化

試料魚肉としてボラ，スマ及びキワダの普通肉を用いた。砕肉 60 g に水 240 cc とチモールの 10% トルオール溶液 9 cc を加えてホモジナイザーで処理した後，カツオ幽門垂粗酵素液（幽門垂の 3 倍量冷水浸出液）20 cc を添加して 30°C に保存し，アンモニア態及びアミド態窒素の変化を調べた。前者は減圧蒸溜法によつて定量し，後者は試料を 5 %塩酸濃度で 2 時間煮沸した場合に於けるアンモニア態窒素の増加量を以て表わした。なおキワダ肉については上記幽門垂酵素の代りにパンクレアチン 0.5 g を添加作用せしめ，又基質として生肉の外煮熟肉（100°C，10 分）を用いたものについて実験した。使用した上記酵素剤自体から出るアンモニア及びアミド態窒素は別に定量して差引いたがその量は極めて少なく，殊にパンクレアチンは両者とも定量にかゝらなかつた。結果は Table 1 の如くであるが，対照は 100°C に 10 分間加熱した前記酵素剤を添加したものである。

1957 年 9 月 5 日受理

Table 1. Change of ammonia and amide nitrogen in fish muscle by extracts of pyloric coeca. (Fresh basis)

Species	Incubation time (days)	Raw muscle with pyloric coeca extracts			Raw muscle with boiled pyloric coeca extracts		
		NH_3-N (mg%)	Amid-N (mg%)	Sum (mg%)	NH_3-N (mg%)	Amid-N (mg%)	Sum (mg%)
Mugil cephalus (Bora)	0	13	156	169	14	154	168
	1	43	131	174	15	148	163
	3	81	89	170	17	150	167
	5	102	74	170	17	151	168
Euthynnus yaito (Suma)	0	23	170	193	22	171	193
	1	37	164	201	23	167	190
	2	64	142	206	27	168	195
	3	102	114	216	25	170	195
		Raw muscle with pancreatin			Boiled muscle with pancreatin		
Germo macropterus (Kiwada)	0	21	174	195	21	174	195
	1	33	167	200	25	170	195
	2	43	156	199	27	167	194
	3	51	150	201	29	166	195
	4	57	151	208	31	163	154

生肉に幽門垂酵素を作用せしめたボラ，スマではアンモニアの生成に伴つてアミド態窒素は次第に減少し一方対照区では殆んどアンモニアの生成が見られないが同時にアミド態窒素にも変化がない。キワダは前記の如く生肉と煮熟肉を用い，幽門垂酵素の代りにパンクレアチンを用いて見たが，この場合もアンモニア生成量の多い生肉を基質としたものではアンモニア増加量に対応してアミド態窒素の減少量が多く，煮熟肉を基質とした場合はアンモニア生成量の少ないのに相応してアミド態窒素の減少量も少ない。次にアンモニア態窒素とアミド態窒素を合計した値を見ると，ボラ，スマの対照区とキワダ煮熟肉では終始一定値を保つているが，生肉を基質とした場合は何れも放置時間の経過につれて僅かに増加してくる傾向が見られる。

以上酵素反応の進むに従つてアミド態窒素が減少し，一方ほゞこれに相当する量のアンモニアが増加することから考えると，この反応系で生成するアンモニアの大部分はアミドに起因することが推定されるが，アミドに由来せぬアンモニアも極めて少量には存在するものゝ如くである。

実験 2. カツオ幽門垂の自己分解の場合のアンモニア及びアミド態窒素の変化

普通鮮度のカツオから幽門垂を採り，裏ごしにかけた後2倍量の水を加え，更にその全量の3％相当量のトルオール（チモール 10% 含有）を添加してホモジネートとし，30°C に貯蔵した場合のアンモニア態及びアミド態窒素の変化をしらべた。定量方法は実験1の場合と同様で，その結果は Table 2 に示した。

Table 2. Change of ammonia and amide nitrogen during the autolysis of pyloric coeca (Fresh basis)

Incubation time(days)	NH_3-N (mg%)	Amid-N (mg%)	Sum (mg%)
0	62	105	167
1	101	83	184
2	114	77	191
3	124	69	193
4	131	67	198
6	143	60	203
9	159	50	209
16	183	38	221
23	202	21	233
30	217	28	245

幽門垂自己分解の場合もアンモニアの増加に伴つてアミド態窒素の減少することは，魚肉に幽門垂酵素を作用せしめた実験1の場合と同様であるが，明らかに異なつているのはアンモニアの増加量に比較してアミド態窒素の減少量が遙かに少ないことで，その結果としてこの両窒素を合計した値は表に見られるように，貯蔵期間が長くなるにつれて明らかに増加しており，その増加状態が前実験の生魚肉を基質とした場合よりも遙かに多くなつている。

以上の結果から幽門垂自己分解の場合に生成さ

れる著量のアンモニアは，魚肉に幽門垂酵素を作用せしめる場合に生ずるアンモニアと同様，一部はアミド態窒素に由来するものゝ如くであるが，それ以外の未知の物質を前駆体とするアンモニアが相当多量に生成していることが分る。この後者のアンモニアが生魚肉を基質とした場合にも微量存在することは前に述べた所であるが，幽門垂自己分解の場合はこの未知前駆物質に由来するアンモニア量が著しく多い点で魚肉の場合と異なつている。

実験 3. アンモニア生成と pH との関係

これまでの実験は pH については特に考慮せず魚肉又は幽門垂に単に水を加えてホモジネートとしたものを基質として実験を行つて来た。併し前記アンモニアが酵素反応による生成物とすればその生成量は pH によつて当然影響を受ける筈である。依つてこの関係を知るために幽門垂の自己分解及びサバ肉を基質とし，これに幽門垂酵素を作用せしめた二つの場合について実験した。実験方法は試料（サバ砕肉及びカツオ幽門垂）25 g にチモールの 10% トルオール溶液 8 cc を加え，これに各 pH 価のマキルベン緩衝液を加えて全量を 200 g とし，ホモジネートとして 30°C に貯蔵しアンモニア生成量を測定した。但しサバ肉を基質とするものには幽門垂粗酵素液（前実験に同じ）10 cc を添加した。その結果は Fig. 1, 2. の如くである。

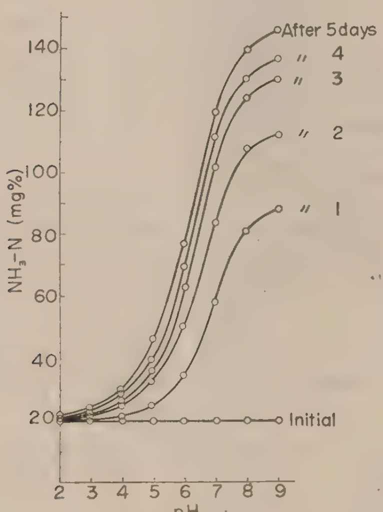


Fig. 1. Effect of pH on the generation of ammonia from mackerel muscle by pyloric coeca extracts.

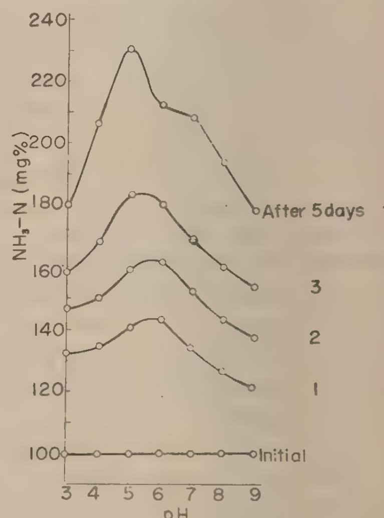


Fig. 2. Effect of pH on the generation of ammonia during the autolysis of pyloric coeca.

サバ肉を基質としこれにカツオ幽門垂酵素を作用せしめる場合に生成するアンモニアは Fig. 1. に見られるように酸性側に於ては少なく，この実験で設定した pH 範囲では最もアルカリ性の pH 9 に於てアンモニア生成量が最大である。pH 9 以上は実験しなかつたのでアンモニア生成に対する至適 pH は明らかにされなかつたが 9 附近（或は 9 以上）と思われる。次に幽門垂の自己分解に際し生成するアンモニア量と pH との関係を Fig. 2. によつて見ると，アンモニア生成量の最も多いのは pH 5～6 附近に於てであつて前記サバ肉に幽門垂酵素を作用せしめた場合アンモニアを生成する反応に対する至適 pH 9（又は 9 以上）とは明らかに異なつている。このように至適 pH が明らかに異なつていることから考えると，生成物は等しくアンモニアではあるが，サバ肉に幽門垂酵素を作用せしめる場合にアンモニアを生成する酵素反応と，幽門垂の自己分解に際しアンモニアを生成する酵素反応とが全く同一種類のものであるとは言い得ないようである。

総　　括

魚肉に幽門垂酵素又はパンクレアチンを作用せしめる場合及びカツオ幽門垂が自己分解する場合について

アンモニア生成量とアミド態窒素の変化を調べた所，前者の場合は酵素反応の進むにつれてアミド態窒素が減少し，同時にほゞこれに相当するアンモニアの生成を見るので，アンモニアは主としてアミドに由来するものゝ如く考えられるが，幽門垂自己分解の場合はアンモニア態窒素の増加はアミド態窒素の減少量を明らかに上廻り，従つてアミド以外に未知のアンモニア前駆物質の存在することが推定された。

又上の二つの場合に於てアンモニア生成と pH との関係を調べた所，サバ肉に幽門垂酵素を作用せしめた場合には pH 9（或は 9 以上）でアンモニアの生成が最高を示したが，幽門垂自己分解の場合には pH 5～6 に於てアンモニア生成量が最も多く，アンモニア生成に対する至適 pH が明らかに異なることを知つた。

文　献

1) 柏田研一：本誌 **21**, 494 (1955).
2) 〃 ：〃 〃, 498 (1955).

魚の組織に含まれる Chlortetracycline の Pad plate microbioassay の一改良法

富山哲夫・津田　厚・米　康夫
（九州大学農学部水産化学教室）

An improved method for pad plate microbiologic assay of chlortetracycline (CTC) in tissues

Tetuo TOMIYAMA, Atsushi TSUDA, and Yasuo YONE

TOMIYAMA et al[4] reported that the sensitivity and recovery of their modified method for CTC assay in fish tissues were 0.02 mcg/cc and about 85 %, respectively.

A study has been made, therefore, of improvement of the extractant and the assay media in order to obtain higher recovery and sensitivity. From scrutinizing various factors governing the recovery and sensitivity, it has been found that the following modified method is quite feasible and reliable.

A 20 g aliquot of well comminuted and homogenized sample tissue is further mixed with 80 cc of the extractant (35 parts of M/10 citrate (pH 5.2)+65 parts of acetone) for about two minutes using Waring blender, followed by filtration with a dry filter paper. Each of three pad discs was dipped into the clear filtrate, excessive liquid being removed by touching on the glass wall, and then placed on an plate together with 0.02 mcg/cc reference. Four series of the standard CTC solution (0.08, 0.04, 0.01 and 0.005 mcg/cc of M/10 citrate (pH 5.7)+acetone) were placed on separate plates, three plates for each level. Each plate contains 3 discs of a standard solution plus 3 discs of the 0.02 mcg/cc CTC reference.

All the plates were incubated overnight (15–18 hrs) at 30°C. The content of CTC can be calculated as follows :

By employing the following formula, correction can be made of each standard set ; $S_i = s_i + (R - r)$, where, S_i is corrected value of s_i, s_i, average of nine readings for three dishes of standard set having i mcg per cc, R, average of 36 readings for all the reference on all the standard series, and r, average of nine readings for the reference placed on the three standard dishes. Draw the standard curve by plotting these corrected zone diameters, S, together with the average of the 36 readings, R, and the corresponding concentration of CTC (mcg per cc) on semilogarithmic paper, the concentration being plotted on the logarithmic scale. In the sample set, similarly calculate Pi, correced value of zone size for sample solution by using the following formula ; $P = p + (R - r)$, where P is aveiage of nine readings for sample set, R and r are the same as the foregoing formula for S_i. From the standard curve read the concentration, A mcg/cc which corresponds to the corrected value of zone size, P. Then, the antibiotic content of the sample tissue can be calculated by the following formula ; C (mcg/g tissue) = A × (80+20), /20.

The preparation of test organism, i. e., spore suspension of *B. cereus* No. 213 and of seed layer is the same as described by GROVES and RANDOLL.[7] The method herein reported was shown to give recovery of 93 % and the sensitivity of 0.005 mcg/cc.

緒　　　言

魚類を漁獲直後 round のまゝ Chlortetracycline (CTC と略記) の液に浸漬，或は CTC 氷の下に保蔵すると鮮度が良好に保持出来ることについては，富山及び協同者[1]の研究がある。しかし CTC を魚類の鮮度保持に使用するには日本の場合には食品衛生法，カナダの場合には Food and Drug Regulations，また米

1957 年 12 月 16 日受理　　(印刷費負担)

国の場合には Federal Food, Drug and Cosmetic Act によつて安全最大許容量の決定が必要である。米国[2]，カナダ[3]，及び日本[4) 5) 6)]における研究では各種魚類を round のまゝ CTC に浸漬，或は CTC 氷蔵した場合の浸透量は極めて少量であつて，料理及び加工によつて殆んど検出しえられない程度となるので，カナダにおいては Tolerance を 5 ppm，わが国の底曳魚では 0.1 ppm として許可されている，この Tolerance を合理的に定めるためには感度がよく回収率の高い CTC の定量方法が必要である。

Chlortetracycline の microbioassay は *Micrococcus aureus* を用いる比濁法[7] 及び *B. cereus* を用いる cylinder-plate 法或は padl-plate 法によつてなされている。後者は定量の感度が高いので，血液や食品中の微量の CTC の定量に用いられている。例えば DORNBUSH[8] は *B. cereus var. mycoides* (ATCC 9634) PCI-213 を用いる cylinder 法が血清中の CTC の定量に充分な精度と感度とを与えることを示し，これは米国の FDA の方法[7] として採用されている。

しかし筋肉組織の場合には血清の場合と異り，抽出操作が先行するので，抽出剤の種類によつては cylinder 法は用い難く，また多数の試料を取扱う場合には pad plate の方が簡易であるから，American Cyanamid Inc. では *B. cereus* #5 の胞子を加えた培地を用いて GRADY and WILLIAMS[9] が飼料中の CTC の定量を，また BROQUIST and KOHLER[10]，KOHLER et al[11] ABBEY et al[12] が鳥肉中の CTC の定量を行つている。わが国では富山，米，三ケ尻[4] が魚肉中の CTC の定量にこれを応用している。

これらの方法によると，CTC の回収率はいづれも 60～85％ 程度であつて，CTC の抽出法が完全でないことは明かである。また CTC に対する高い感度を必要とする場合には培地の組成，base layer 及び seed layer の厚さ，その厚さの均一性，抽出剤の種類等が考慮されねばならないが，それらの基礎的研究が文献にみられない。

著者等は CTC で処理した魚体組織中への CTC の浸透量及び加工或は加熱後の CTC 残存量を測定する研究に当つて CTC の回収率及び感度の上昇を計る必要に直面した。依つて pad plate 法による定量法の基礎的条件を種々検討した結果，上記の目的をほぼ達成したので，改良法並びに改良の根拠についてここに報告する。

定　量　方　法

1. 必要な器具，試薬及び培地

a. シヤーレ： 水平で平担な内部底面をもつ径 9 cm のペトリ皿を用いるが，市販今里シヤーレはこの要求を充している。ペトリ皿は 100°C に乾燥しただけで直ちに使用でき，特別に乾熱滅菌は必要でない。シヤーレの蓋に生ずる水滴が培地の表面に落下することを防ぐために素焼の蓋を用いるか，内面に濾紙をはさむことが行われているが，著者等の経験ではその必要を認めない。もし水滴落下の危険がある場合は蓋の内面に撥水性シリコーンを塗ることによつて避けることができる。但しシヤーレの底にシリコーンがつくことは培地を底面に均一に流すのに多少支障があるので，洗滌する場合に蓋は別個に取扱うべきである。

b. Pad disc： Carl Schleicher & Schuell Co. の No. 740-E, 1/4 inch diameter のものを用いる。

c. Waring blender： 市販のミックサーを使用する。

d. 抽出剤及び稀釈液： pH 5.2 のM/10 のクエン酸緩衝液 (M/5 クエン酸： N/2 KOH： H_2O＝100：95：5) の 35 容とアセトン 65 容とを混合し，冷却しておく。CTC 標準曲線を作るための CTC の標準液をつくるには，pH 5.6 の M/10 クエン酸緩衝液の 35 容とアセトン 65 容との混合液を用いる。

e. CTC 標準液： CTC-HCl の結晶 80.0 mg を蒸溜水にとかし，100 cc に定容する。(800 mcg/cc) これから正確に 2 cc づつ小型試験管に分注し，ポリエチレン膜で蓋をし，凍結して保存する。凍結状態では一ケ月間効力の低下はないが，融解したものは再び凍結保存は出来ない。

定量用の標準曲線を画くには CTC 1.6 mg を含む小試験管の内容を定量の度毎に稀釈用の pH 5.6 の citrate－acetone 稀釈剤で稀釈して 100 cc に定容し，その 1 cc を更に 100 cc に定容して 0.16 mcg/cc の液をつくり，これを順次に倍づつに稀釈剤で稀釈して，濃度を 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 及び 0.005 mcg/cc とする。

f. 胞子懸濁液： 胞子化細胞をつくるには前報[4] では通気液体培養による方法を採用したが，固体培養による ABBEY et al[12] の方法の方が雑菌の汚染も少く優れていることを確認した。この方法は寒天培地 #1

(Table 1) の斜面培地 5 本に *B. cereus var. mycoides* (ATCC 9634) PCI-213 を比較的多量に塗布し，30°C で 24 時間培養する。この斜面の菌を各 1 cc づつの滅菌水で洗いおとしたものの全部を 200 cc の寒天培地 #1 を入れた Roux フラスコの表面に流し込み，滅菌したガラス玉を用いて培地の全表面に均一にぬりひろげ，30°C で約 1 週間培養する。生じた胞子化細胞を 30 cc の滅菌水を用いて寒天表面より洗い落し，50 cc の共栓つき遠心管に移して 65°C の湯煎中で 30 分間加熱する。遠心と滅菌水による洗滌を 3 回繰返し，最後に再び 65°C で 30 分間加熱したものを共栓つき 50 cc の三角フラスコに移して冷蔵庫に保存する。この胞子懸濁液の培地への添加量は 0.005〜0.01 mcg/cc の CTC 阻止帯が鮮明に測れるように定めるべきで，概ね 0.1％ 前後である。

g. Assay 用の培地： CTC への感度を高めるように改良した Penassay medium #2 を用いる。その組成は Table 1. に示してある。この組成のうちで yeast extract は市販品がなかつたので，市販エビオス 3 g を用いた。Agar 以外の培地成分を約 1 L の蒸溜水に加え，湯煎中で約 15 分間加熱した後に良質活性炭(市販白鷺印) 10 g を加えてよく攪拌し，ついで濾過する。これを 1 L に定容し，必要に応じて寒天末 1％ を加え，15 lbs で 10 分間滅菌する。冷時の培地の pH はこのままで殆んど常に pH 5.6〜5.7 であるが，念のためガラス電極を用いて Agar を加える前の pH が 5.6 であることを確かめておくべきである。なお yeast extract は取除いても Assay のための培養時間を少し延長すれば，定量の感度に影響しない。

2. 定量操作

(i) CTC の抽出

供試組織は細かく切断した後に少量づつ直接 Waring blender に加えて攪砕する。この均一化した試料 20.0 g と抽出剤 80 cc を乾いた blender に加え，蓋をして 2 分間 blend し，次に乾燥濾紙で濾過する。

(ii) *B. cereus var. mycoides* (ATCC 9634) PCI-213 の胞子をもつ培地の準備。

Assay 用培地は加熱溶解した後 60°C に保ち，予備試験で定めた胞子懸濁液の適量を混和する。この 5 cc づつを今里シヤーレに分注して，厳密に水平な台の上で均一な厚さに固まらせる。この培地は分注後 2 時間以内に使用せねばならない。

(iii) Pad plate の配置

組織抽出液或は標準液を Pad に吸わせるには，Pad を液に浸してから抽出液をいれた試験管の壁に Pad を接触させて余分の液を除くようにする。組織抽出液中の CTC 濃度が 0.1 mcg/cc より低い場合には，供試抽出液を吸わせた Pad 3 枚と 0.02 mcg/cc を吸わせた reference pad 3 枚を交互に計 6 枚おく。同様のシヤーレを 3 個つくつて，供試抽出液を吸わせた pad 総計 9 枚の阻止帯直径がえられるようにする。

これと同時に 0.02 mcg/cc を除く 4 段階の標準濃度 0.08，0.04，0.01，0.005 mcg/cc) の標準液を吸わせた pad disc を各濃度毎に一つのシヤーレに 3 枚と 0.02 mcg/cc のものを 3 枚交互におく。従つて 4 段階について計 12 ケのシヤーレをつくつて標準曲線の作成にあてる。

(iv) 培養と結果の計算

Pad を並べたシヤーレは冷蔵庫に一時間放置し，試料抽出液の拡散及び acetone の蒸散中における胞子の発芽を遅らせる。次に 30°C の孵卵器に一夜 (15〜17 時間) 放置し，生じた阻止帯の直径を計測する。計測には Quebec の見取器があるが，キャリパーで充分である。結果の計算法は次の通りである。
3 枚のシャーレにのせた或標準液濃度 (i mcg/cc) の pad 計 9 枚の阻止帯直径平均値 s_i と，0.02 mcg/cc の pad 9 枚の阻止帯直径平均値 r を求める。他方，全標準液系列のシャーレにのせた 0.02 mcg/cc の全部の pad 36 枚の阻止帯直径平均値 R を求める。これらの値からこの標準液の阻止帯補正値 S_i は$S_i = s_i + (R-r)$ で求められる。この阻止帯直径の補正を各標準液毎に行う，次に半対数グラフに濃度を対数軸にとり，補正した阻止帯直径に対しプロットすると標準直線がえられる。次に供試液系列の 3 枚のシャーレにのせた供試液の pad 9 枚の阻止帯直径平均値 p 及び 0.02 mcg/cc の qad 9 枚の阻止帯直径平均値 r_p を求めると，同様に補正値は $P = p + (R - r_p)$. P に相当する CTC 濃度 (mcg/cc) A を標準直線から求めると，供試組織の CTC 含量は A×(80+20)/20 mcg/g或は ppm となる。

研　究　結　果

1. CTC に対する B. cereus の感度に及ぼす培地成分の影響。

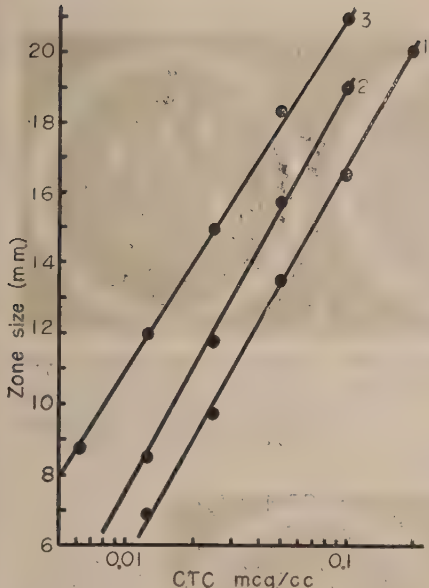


Fig. 1. The effect of composition of media on the sensitivity.

1. TOMIYAMA et al's medium (a modified Penassay medium where beef extract was substituted with a liver extract), diluent : pH 4.2 HCl-acetone extract.
2. Modified penassay medium given in Table 1, diluent : pH 4.2 HCl-acetone extract.
3. Modified penassay medium (ditto), diluent : pH 5.7 citrate-acetone.

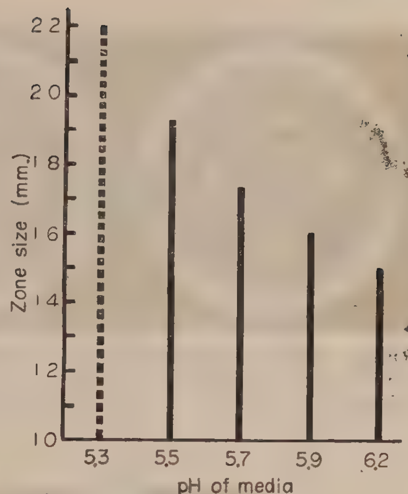


Fig. 2. The effect of pH of medium on the sensitivity of test oranism.
Conc. of CTC : 0.05 mcg/cc, diluent : citrate-acetone.
-------- difficult to measure the zone size since the growth of the test organism was markedly inhibited by the low pH of medium.

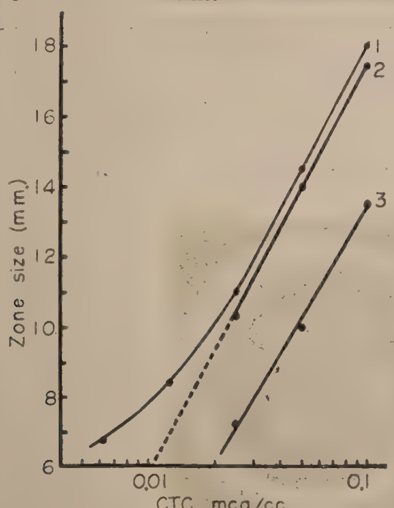


Fig. 3. The effect of treatment with charcoal and of placing base layer on the sensitivity of test organism. Diluent : M/10 KH_2PO_4

1. Medium treated with charcoal
2. Medium non-treated
3. Medium having base layer

--------boundary of inhibifory zone was not clear enough to measure.

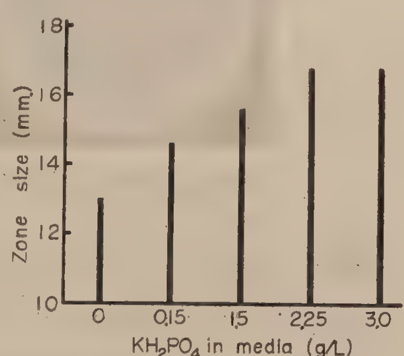


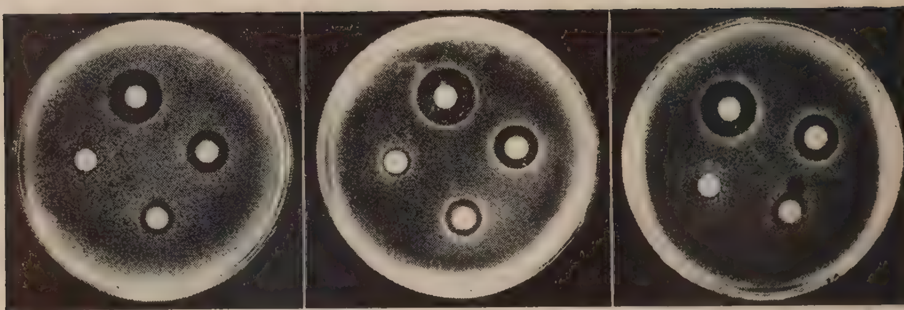
Fig. 4. The effect of KH_2PO_4 in media on the sensitivity of the test organism.
Conc. of CTC : 0.05 mcg/cc. Diluent : M/50 citrate buffer.

Table 1. Composition of Penassay medium.

	Medium No. 1	Medium No. 2*
peptone	6 g	6 g
pancreatic digest of casein	4 g	
yeast extract	3 g	3 g
beef extract	1.5 g	1.5 g
dextrose	1 g	
KH_2PO_4		3 g
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05 g	
agar	15 g	10 g
pH**	6.5 to 6.6	5.6 to 5.7
total volume	1000cc	1000cc

* Medium No. 2 is treated with 10 g charcoal before addition of agar.

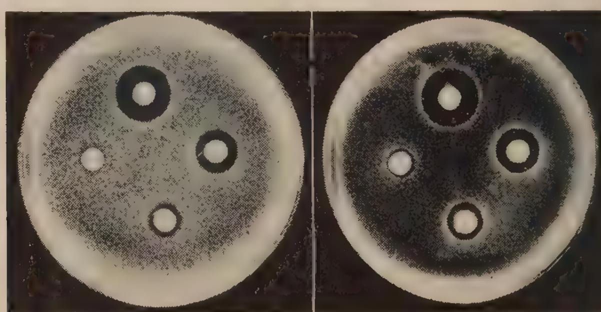
** pH value after sterilization.



Penassay medium non-treated. Strain # *213*, after 16 hr. culture.

Penassay medium treated with charcoal. Strain # *213*, after 16 hr. culture.

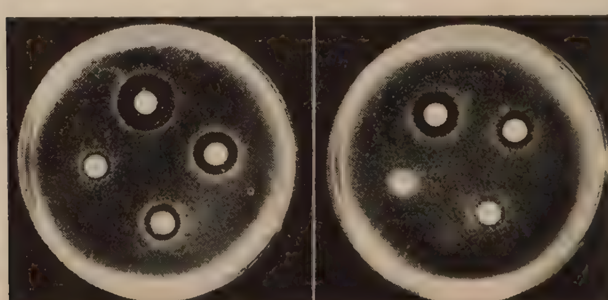
Penassay medium treated with charcoal and then added with 1 mcg/cc of vitamin B_1, B_2, niacin, pantothenic acid and PGA. Strain # *213*, after 16 hr. culture.



Penassay medium non-treated. Strain # *213*. after 40 hr. culture.

Penassay medium treated with charcoal. Strain # *213*, after 40 hr. culture.

Fig. 5. The effect of treatment of Penassay medium with charcoal on the sensitivity of test organism.
Conc. of CTC tested are 0.04, 0.02, 0.01 and 0.005 mcg/cc.



Modified Penassay medium, Strain # *213*, after 16 hr. culture.

Modified Penassay medium, Strain # *5*, after 16 hr. culture.

Fig. 6. Ae comparison of sensitivities between *B. cereus* # *213* and *B. cereus* # *5* as test organisms.

Assay 用培地として KOHLER et al[11], ABBEY et al[12] はBrain-heart infusion broth を含むものを用い，富山等[4] は Penassay 培地の beef extract の代りに肝抽出物を添加したものを用い， FDA[9] では Difco Penassay base agar (# B 270)を用いている。ここでは富山等の培地と Penassay 培地とを比較検討してみた。結果は Fig.1 にみられるように生長因子をもつ培地では CTC に対する検定菌の感度が悪く， Penassay 培地が優れた結果を示した。

次に培地の pH によつて感度がいかに変化するかを吟味した結果は Fig.2 の通りである。即ち pH の低下と共に感度は上昇するが， pH 5.5 以下では菌の発育が悪く鮮明な阻止帯をうる事が困難であつた。

Penassay 培地では 0.01mcg/cc 以下の濃度では発育阻止帯の輪廓が明瞭でない欠点があるので，阻止帯直径の測定に多少困難がある。また阻止帯の大きさが培養時間の延長と共に小さくなる欠点もある。そこで寒天を含まない Penassay 培地 1L を 10g の活性炭で処理して培地の生長因子の除去を試みたところ，Fig.3 及び5にみられるように *B. cereus* の発育及び CTC に対する感度には大差がなかつたが， CTC の低濃果における阻止帯が精密に測定でき，阻止帯が培養時間の延長と共に縮小して不鮮明化するような変化は認められなかつた。

DORNBUSH[8] は感度の向上に KH_2PO_4 の添加を推奨しているので，KH_2PO_4 の最適添加量について検討してみた。その結果は Fig. 4 に示してあるように 2.25 g/L で感度向上効度は約 1.6 倍で一定となつたので，培地には 3 g/L の割合に添加することとした。

培地の厚さは薄いほど感度が高いのは当然であるが，薄層を用いると普通のペトリ皿の底の凹凸が大きく影響する。従つて Base layer を先ず流し込んで，次に Seed layer を上に重ねることが推奨されている。著者等は普通市販されているペトリ皿を用い， Seed layer と同じ厚さの Base layer を敷いた場合の感度の変化を吟味したところ Fig.3 に示すように感度は 1/2.5 に低下した。またペトリ皿の底の凹凸が甚しい場合には Base layer を用いても阻止帯の直径の変動を防ぎえない事が観察された。 従つて本改良法では Base layer の使用をやめてペトリ皿の内底面の平坦な特殊シャーレを用い Seed layer を薄層として用いるようにした。

2. 検定用菌株と感度との関係

著者等の研究室では *B. cereus* No.5 を用いていたが，最近 Lederle Laboratories の DORNBUSH 氏より *B. cereus var. CI/mycoides* (ATCC 9634) PCI-213 の分与をえたので，両者の CTC に対する感度の比較を行つた。その結果は Fig. 6 及び 7 にみられるように No. 213 の方が No. 5 の2倍以上もよい感度を示した。また阻止帯の輪廓も No. 213 の方が明瞭であるから阻止帯の直径の測定が容易であつた。

3. 冷蔵庫に保持する操作が定量の感度に及ぼす影響

Pad plate に用いる CTC の assay には Pad を並べ終つ

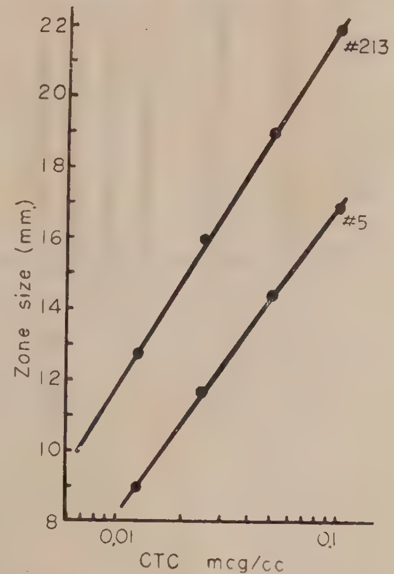


Fig. 7. A comparison in sensitivity between B. cereus #213 and #5.
Medium : the modified Penassay medium.
Diluent : pH 5.7 citrate-acetone.

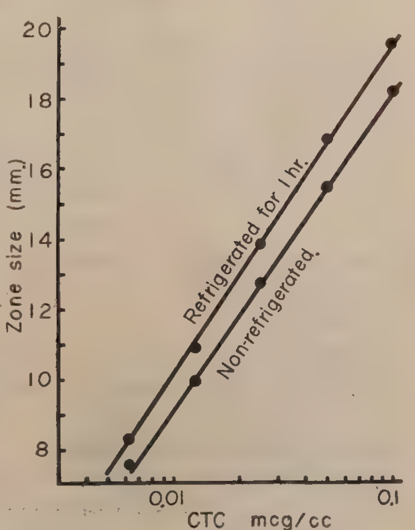


Fig. 8. The effect of refrigeration of test plates on the sensitivity of the test organism.
Diluent : citrate-acetone

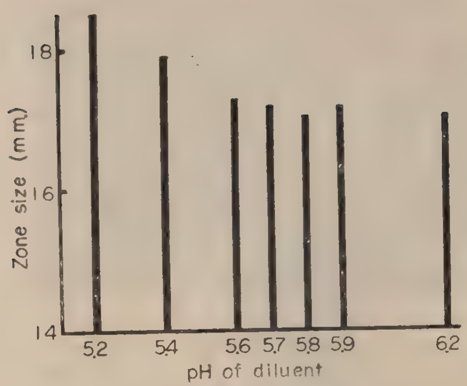


Fig. 9. The effect of pH of sample solution on the sensitivity.
Diluent : citrate-acetone, conc. of CTC : 0.05 mcg/cc

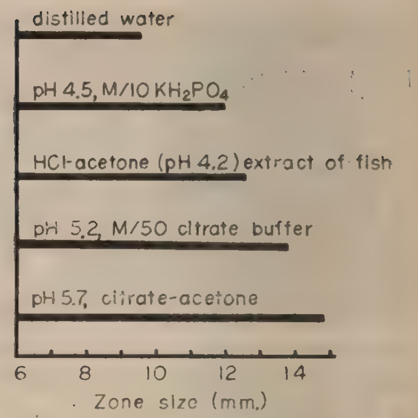


Fig. 10. The effect of kinds of diluents on the sensitivity.
Conc. of CTC : 0.025 mcg/cc

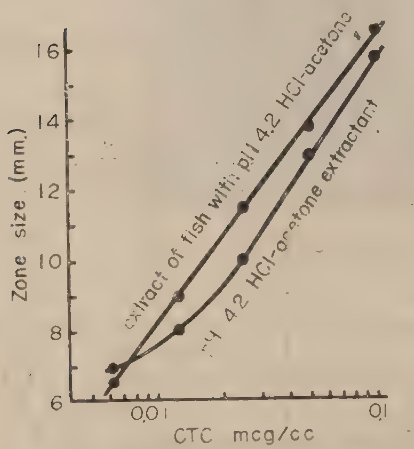


Fig. 11. The difference of sensitivity to CTC dissolved in a HCl-acetone extractant (pH 4.2) and in extract of fish flesh with the extractant.

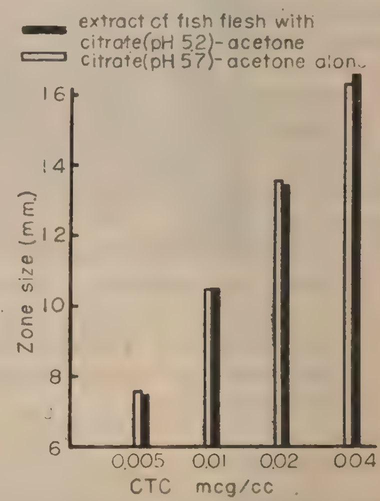


Fig. 12. Comparable sensitivity whether CTC dissolved in pH 5.7 citrate-acetone or in extract of fish flesh with pH 5.2 citrate-acetone.

た後に約1時間冷蔵庫内に放置するよう指示されている[4) 9)]。この処理がどの程度に定量感度を支配するかについて研究した結果は Fig.8 に示すようであつた。冷蔵しない場合には単に感度が悪いだけでなく，恐らくアセトンによる阻害のためと思われるが，低濃度の部分に誤差を生ずることが認められた。

4. CTC の溶媒が感度に及ぼす影響

培地の pH は感度に重要であるが，もし溶媒の緩衝能が高い場合には培地の pH を移動させることがありうるので，citrate-acetone 混液の pH を変えて感度に及ぼす影響をみた。その結果は Fig. 9 にみられる通り pH 5.6 より 6.2 までは影響しないが，pH 5.6 より低い場合には感度が更に上昇する。しかしこれは見掛けの増加であつて，pH があまりに低いと盲検に阻止帯が現れるので pH 5.6 より低下することはできない。実際に魚肉組織を pH 5.2 の citrate-acetone で抽出すると多くの場合 pH は 5.7～6.0 となるので，pH5.2

Table 2. Recovery (%) of CTC from fish flesh.

Species of fish \ Extractants / CTC (ppm)	citrate-acetone 0.5	0.2	0.1	pH 4.2 HCl-acetone 0.5	0.2	0.1
	%	%	%	%	%	%
"eso" *	94		95			
"hamo" **	93		90	86	80	
"aji" ***	89		89			
"itoyoridai" §	94		91			
"shiroguchi" §§	92		89	82		85
"tai" §§§	94		99	83		
"saba" †	94		94	69		
"konoshiro" ††		98			76	
"kidai" †††				85		80

* Lizard fish, *Saurida undosouamis* ** Sea eel, *Muraenosox cinereus* *** Horse mackerel, *Trachurus japonicus* § *Nemepterus virgatus* §§ Croaker, *Argyrosomus argentatus* §§§ *Chrysophrys major* † Mackerel, *Scomber japonicus* †† *Clupanodon punctatus* ††† *Taius tumifrons*

Table 3. Recovery of CTC from fish flesh using various extractants.

Extractants	Sp. of fish	CTC	Recoyery
		ppm	%
M/10 KH_2PO_4	"shiroguchi" *	0.5	72
〃 〃	"konoshiro" **	0.2	68
M/10 KH_2PO_4+200 ppm HMP ****	〃	0.2	82
M/50 citrate buffer	"saba" ***	0.2	89

* Croaker, *Argyrosomus argentatus* ** *Clupanodon punctatus* *** Mackerel, *Scomber japonicus* **** Na-hexametaphosphate

の抽出剤を用いても感度には影響がない。しかし標準曲線をつくるためには Fig. 9 の結果からみて pH 5.6 の citrate-acetone を使用すべきである。

CTC の溶媒として蒸溜水，M/10 KH_2PO_4，M/50 citrate buffer (pH 5.2) 及び citrate-acetone 混液(定量法参照)を比較した結果は Fig. 10 のようである。水溶液では最も感度が低く，M/10 KH_2PO_4 では水よりも感度が上昇し， citrate の水溶液及びアセトン溶液では最もよい感度を示した。しかも後者の水溶液とアセトン溶液との間には感度の差異が認められなかつた。またアセトン溶液について比較すると， pH 4.2 の HCl-acetone にとけた CTC よりも pH 5.7 の citrate-acetone にとけた CTC の方が検定菌に対し遙かに高い感度を与えた。しかしFig. 11 に示すように，pH 4.2 の HCl-acetone で魚肉を抽出した液に CTC をとかした場合の感度は，抽出溶剤のみに CTC をとかした場合よりも多少高い感度を示した。これに反し，pH 5.2 の citrate-acetone で筋肉を抽出した液に CTC をとかした場合には， Fig. 12 に示すように citrate-acetone (pH 5.7) のみにとかした CTC と全く同一感度を示した。

5. CTC の回収率に及ぼす抽出剤の影響

組織中の CTC を抽出するには 0.57N HCl-acetone[4)10)]， pH 4.2 の HCl-acetone[12)] 或は M/10 KH_2PO_4 が使用されている。著者等は 0.57N HC lacetone を用いた場合の pad plate 法による回収率は 85 %以上に増加しえないことを報告した[4)]。

従つて最近までに報告された抽出剤について検討したところ， pH 4.2 の HCl-acetone を用いた場合の pad plate 法による回収率は Table 2, 及び3にみられるように平均 81 % であり， M/10 KH_2PO_4 抽出剤の場合の cylinder 法による回収率は 70 % に過ぎなかつた。かように従来の抽出剤でいずれも回収率の悪いのは一部の CTC が組織とキレートしているためと推定し， citrate-acetone を抽出剤として用いてみた。即ち魚肉に一定量の CTC 水溶液を加えてよく blend した後，80 cc の抽出剤を加えて2分間 blend し，乾燥濾紙でえた濾液を用い Pad plate 法にかけた。その結果は Table 2 に示したように 0.1～0.5 ppm のCTC の範囲では含量による変動は少く，平均 93% をえた。前項に示したようにこの抽出剤にとかした CTC

Table 4. The stability of CTC in $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$ containing solution with or without citrate.

Initial conc. of CTC (ppm)	$Fe^{\cdot\cdot\cdot}$(ppm)	K citrate	CTC after 24 hrs. at 30°C(ppm)
5.0	0.5	0	3.1
5.0	0.5	M/50	4.2
5.0	0	0	4 5

Table 5. The relative sensitivity of several preservatives in the present assay method.

Preservatives	Minimum inhibitory concentration	Relative sensitivity §
CTC	0.005 mcg/cc	0.1 mcg/cc
5-Nitro-2-furfral-semicarbazone *	0.3 〃	20 〃
Dehydroacetic acid	1,000 〃	4,000 〃
Butyl-p-oxybenzoate **	200 〃	3,000 〃
o-hydroxybenzamide ***	1,000 〃	4,000 〃
Na-borate	1,000 〃	2,000 〃
Sorbic acid ****	1,000 〃	2,000 〃

§ Concentration required to yield a comparable zone size with that of 0.1 mcg CTC per ml.
* Furaskin ** Salicydole *** Saliamine **** 2.4-hexadienoic acid

に対しては検定菌の感度はかなりに高いので，組織中の微量の CTC の定量には citrate-acetone は好適な抽出剤といえる。

なおキレートした CTC が抽出され難いのであろうとの推定を確かめるために hexametaphosphate の効果を試験した。このものは 65％のアセトンに溶解し難いので M/10 KH_2PO_4 に添加して回収率の試験を行つたところ M/10 KH_2PO_4 のみでは 68％のものが 82％に上昇した。なお M/50 citrate buffer (pH 5.2) のみを抽出剤として用いた場合は 89％ であつた (Table 3)。

6. 魚肉中の CTC 定量に対する妨害物質

CTC は温度の上昇と共に著しく不活性化するが[4) 13)]，また酸化剤の存在によつても不活性化される。一般に魚肉には Cl_2 の存在は考えられないが，第二鉄イオンによる妨害の起る可能性がある。しかし Table 4 にみられるように CTC の第二鉄イオンによる破壊は citrate の存在によつて防止できることは明かとなつた。

なお CTC 以外の防腐剤が存在すると，CTC と同様な発育阻止帯ができる筈であるから，種々の食品防腐剤がどの程度定量阻害を起すかを研究した結果は Table 5 のようである。即ち CTC による阻止帯と同じ大きさの阻止帯を与えるためにフラスキンは CTC の 200 倍の濃度を必要とし，他の防腐剤では 20,000～40.000 倍の濃度を必要とするので，一般に使用されている濃度では CTC の定量値を妨害することはありえない。

IV 考　　察

CTC の濃度が 0.005～0.04 mcg/cc の範囲の微量を定量するには，従来報告された microbioassay のうちで *Micrococcus pyogenes var. micrococcus* を用いる比濁法は感度が低いので適用し難く，ただ *B. cereus* の胞子懸濁培地を用いる Pad plate 法或いは cylinder 法のみが利用出来る。本研究では Pad plate 法の感度及び精度をあげるために基礎条件を検討して興味ある結果をえたので，これらについて考察を加えたい。

感度のよい培地としての条件は，pH が 5.6 であり，適量の第一燐酸カリを含み，また生長因子の少いことであつた。この結果はこのような発育に不適当な条件の下では胞子から発芽したばかりの細胞が CTC の存在に敏感になることを意味する。本研究で採用した培地の活性炭処理が低濃度の阻止帯を測りやすくした点は低濃度の測定精度を高めるのに寄与するところが大である。文献をみるとビタミン類特に B_2[14)]，B_1，niacin，pantothenic acid[15)] が CTC による細菌の生長阻止を軽減するとの報告がある。従つて著者等は Fig. 5 に示すように，活性炭処理した培地にビタミン B 群を添加し，*B. cereus* ＃213 を培養したところ活性炭

処理の効果が減少した。このことは培地の活性炭処理の効果は明らかに生長因子の除去によるものであることを裏書きしている。今後更に感度を増大しようとするには，培地の生長因子を更に低減すること，また菌体内における生長因子の生合成を抑制するような手段を試みるのも一案であろう。なお第一燐酸カリの添加によつて感度が上昇する理由としては pH 5.6 における緩衝能が増加したことの外に恐らく燐酸塩の増加によつて発芽細胞の代謝が促進されて細胞内の生長因子の消耗を来し，その結果 CTC に対して鋭敏となることも考えられる。

定量法の感度及び精度は培地の組成だけでなく，菌株，定量操作及び抽出剤の種類によることが本研究で明かとなつた。

菌種については *B. cereus* No. 5 と No. 213 を比較した結果は No. 213 が約 2.5 倍鋭敏であるだけでなく，低濃度の精度において優れているので，本改良法には No. 213 を採用した。

定量操作のうちでシヤーレに Pad disc を並べ終えた後に1時間冷蔵庫に収容することは感度の向上に重要であつた。この理由は明かにこの操作によつて検定菌の胞子の発芽を押えつつ CTC-acetone 溶液を拡散させ，しかもその間にアセトンも蒸発させるので，発芽したばかりの細胞の生長が鋭敏に阻害されるためとみられる。

組織中の微量の CTC の定量に当つて最も重要な点は CTC の回収率である。もし回収率が CTC の濃度により，また試料によつて変動するのであれば，正確な定量は望み難い。さきに報告した著者等の変改法[4]では回収率が 85％程度で満足なものではなかつた。それ故に KOHLER 等[11]の標準曲線を採用せずに，試料組織と同様な組織で CTC を含まないものに種々の既知量の CTC を添加したものでつくつた標準曲線を使用することによつて，供試抽出液中の CTC の算出と同時に回収率の補正をも行えるよう変改した。しかし実際に多数の試料を取扱う場合及び標準曲線作成用の材料がえられない場合には上記の変改法を実施するのは困難である。それ故に既知量の CTC を単に抽出剤にとかしたもので求めた標準曲線が各種の試料の CTC の換算に使用できることが望ましい。この為には先づ CTC の回収率が高いこと，更に抽出剤にとかした CTC への感度が組織抽出液にとかした CTC への感度と同一である事が要求される。従来の HCl-acetone を抽出剤に用いた場合にはこの要求は充されない。それは肉抽出液にとかした CTC の方が抽出剤のみにとかした同一量の CTC よりも大きい感度を与えたからである。恐らくは組織抽出液中に CTC の安定化の成分が含まれているためであろう。これに反して抽出剤に citrate-acetone を用いた場合には組織抽出物の存在の有無にかかわらず同一感度を示した。しかも citrate-acetone の回収率は魚種並に CTC 含量による変動も少く，平均 93％であつた。従つて前記の二つの条件が完全に満足されたので，標準曲線の作成も簡単となり，低濃度の CTC を含む多数の試料中の CTC を定量できる一新方法が確立されたわけである。なお citrate-acetone を抽出剤に試みたのは，組織中の CTC が恐らく蛋白と結合した金属とキレートしているために抽出し難いのであろうと推定したためである。この推定は M/10 KH_2PO_4 に hexametaphosphate を添加して抽出すると回収率が増大した結果からみて妥当であつたことがわかる。

総　　　　括

魚体組織中の CTC の microbioassay のうちで Pad plate を用いる方法の感度，精度及び回収率の向上について研究し，一つの改良法を提出した。変改した根拠は次のような点に基礎をおいている。

1. 感度を増すためには次のような条件が満足されるべきである。(a) Assay 用培地の pH は 5.6 であること，(b) 培地は KH_2PO_4 の適量（3 g/L）を含有すべきこと，(c) 培地を活性炭で処理して多くの生長因子を除去すること。

2 Assay 用の検定菌としては *B. cereus* ＃5 よりも *B. cereus* ＃213 の方が感度において約 2.5 倍であり，しかも低濃度の CTC による発育阻止帯の輪廓が鮮明であつた。

3. Pad を培地上に並べ終つた後に1時間冷蔵庫に放置することは，acetone を含む抽出剤の場合，定量の感度をあげるのに重要である。

4. 組織中の CTC の抽出剤としては citrate と acetone との混液が従来提唱された抽出剤のいずれよりも優れている。この抽出剤では平均回収率は 93％であつた。

5. CTC は citrate-acetone 液にとかした場合も，この抽出剤を用いた組織抽出液にとかした場合でも *B. cereus* に対し全く同一の感度を与えた。従つて標準曲線の作成には pH 5.6 の抽出剤にとかした既知濃度の CTC 液を直接用いることができる。

6. M/50 citrate にとかした CTC は 0.5 ppm の第二鉄イオンの存在によつても不活性化されなかつた。

7. 現在許可されている食品防腐剤のうちにはそれらの許可濃度の範囲では CTC の microbioassay を妨害するものは見当らなかつた。

文　　献

1) 富山哲夫・野村　稔・黒木俊一： 本誌. **21**, 262～266 (1955).
富山哲夫・黒木俊一・野村　稔： 本誌. **21**, 958～961 (1955).
富山哲夫・黒木俊一・前田伝喜・浜田盛治・本田　彰： 本誌. **22**, 120～135 (1956).

2) Kline, E. F., Abbey, A., Darken, M. A., Firman, M. C., Kohler, A. R., Miller, W. H., Wiley, W. W., Windlan, H. and Upham : *Antibiotics Annual* (1956—1957) p. 997.

3) Boyd, J. W., Southcott, B. A, an' Tarr, H. L. A. : *Antibiotics Annual* (1956—1957) p. 1002.

4) 富山哲夫・米　廓夫・三ケ尻和男； 本誌. **22**, 778—783 (1957).

5) 富山哲夫・米　康夫・津田　厚： 本誌, **23**, 568～571 (1958).

6) 富山哲夫・米　康夫・津田　厚： 本誌, **23**, 572～578 (1958).

7) Grove, D. C. and Randall, W. A : "Assay methods of antibiotics—A Laboratory manual (Antibiotics monographs No. 2)" Medical Encylopedia Inc., New York (1955), p. 48～52.

8) Dornbush, A. C. and Pelcak, E. J. : Ann. New York Acad. Sc., **51**, 218 (1948).

9) Grady, J. E. and Williams, W. L. : *Antibiotics & Chemotherapy*, **3**, 15 (1953).

10) Broquist, H. P. and Kohler, A. R. : *Antibiotics Annual* (1953～1954) p. 409.

11) Kohler, A. R., Miller, W. H. and Brqquist, H. P. : *Food Technology* **9**, 151 (1955).

12) Abbey, A., Darken, M. A., Kline, F. E., Kohler, A. R., Maturi, V. F., Miller, W. H. and Upham, S. D. : *Anibiotics Annual*, p. 831 (1956—1957).

13) Steiner, G. and Tarr, H. L. A. : *Canadian J. of Techn.* **34**, 215～219 (1956).

14) Foster, J. W. and Pittillo, F. : *J. Bact.*, **66**, 478 (1953).

15) Mondolfo, H. and Mondolfo, E. H. : *Bull. Ist. Sieroterap. nilar*, **34**, 536 (1955).

雑　　録

○フルブライト資金給付者募集

在日合衆国教育委員会（フルブライト委員会）は 1958—1959 年度フルブライト往復旅費のみの給付に関する選考を次の要領で発表したので会員にお知らせします。

1. 応　募　資　格

1. 志願者は日本の国籍を有すること。
2. 米国大学，研究所，病院等より招聘又は在籍許可を得ていること。
3. 米国に於ける充分な弗資金による滞在費を確保していること。

2. 応　募　種　別

1. 教　授，研　究　員

日本の博士号を有するもの又は同等以上の学力，経験を有して，米国大学等に於て正規の講義を行うか，または高度の研究を実施するものであること。

○　一般…（臨床医学以外の全科を含む）申込締切日　4 月 21 日

2. 大　学　院　学　生

日本の大学卒業また同等以上の学力を有して米国大学院・研究所・病院等に於て所定の課程を履習するか又は同等の研修を受けるものであること。

○　一般…（臨床医学以外の全科）申込締切日　4 月 28 日

3. 応　募　手　続

下記の事務局内該当係にそれぞれ文書により問合せられることを切望する。

記

東京都千代田区九段２丁目２番地
在日合衆国教育委員会内
教授・研究員・一般係
大 学 院 学 生 係

昭和三十三年二月二十日　印　刷
昭和三十三年二月二十五日　発　行

第二十三巻　第十号

本号定価 150円（送料別）

編集兼発行者　松　江　吉　行
東京都港区芝海岸通り６丁目　東京水産大学内
発　行　所　日 本 水 産 学 会
東京都港区芝海岸通り６丁目　東京水産大学内
振 替 口 座　東　京　５９５２９番

印　刷　者　篠　原　収　二
印　刷　所　東海出版印刷株式会社
発　売　所　東海出版印刷株式会社
東京都中野区江古田３の1223
電 話 中 野 (38) 4101・9108

